ANTIMYCIN X UND PYRIDINDOLOL - GLYCOSIDE
NEUE SEKUNDÄRMETABOLITE AUS STREPTOMYCETEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von
BARBARA M. WAHL
GEB. HILLER
aus Rastatt

~~1985~~
1984

ANTIMYCIN X UND PYRIDINDOLOL - GLYCOSIDE
NEUE SEKUNDÄRMETABOLITE AUS STREPTOMYCETEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von
BARBARA M. WAHL
GEB. HILLER
aus Rastatt

1985

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 1984

Dekan: Professor Dr. K. A. Kovar

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Zähner

2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Reinhard

Meinem Mann

und

meinen Eltern

gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Professor Dr. H. Zähner danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, die vielen wertvollen Anregungen und die großzügige Unterstützung.

Herrn Professor Dr. W. Keller-Schierlein, Herrn A. Geiger und Herrn L. Hagmann, ETH Zürich, gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit, das Überlassen der chemischen Daten und der Spektren sowie deren Interpretation.

Herrn Dr. G. Lazar danke ich für die Überlassung des Stammes Tü 2480.
Dem technischen Personal des Lehrstuhls, vor allem Frau D. Denkmann, sei für die freundliche Hilfsbereitschaft herzlich gedankt, ebenso Herrn K. Wusch für das Zeichnen der Abbildungen.

Allen Mitarbeitern der Lehrstühle Mikrobiologie I und II gilt mein Dank für gute Zusammenarbeit.

Abkürzungen

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA
CBS	Centralbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande
d	Tage
DC	Dünnschichtchromatogramm
demin.	demineralisiert
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
h	Stunden
i.p.	intraperitoneal
LD_{50}	Dosis letalis 50
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MTG	Myceltrockengewicht
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
RP-HPLC	Reversed-phase High Performance Liquid Chromatographie
SDS	Dodecylhydrogensulfat, Natriumsalz
sp.	Spezies
ssp.	Subspezies
TES	N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfonic acid
Tü	Stammsammlung des Lehrstuhles Mikrobiologie I, Institut für Biologie II der Universität Tübingen
U/min	Umdrehungen pro Minute
vvm	Volumen Luft pro Volumen Nährlösung und Minute

Inhalt

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL und METHODEN	6
2.1	Chemikalien	6
2.2	Verwendete Materialien und Geräte	6
2.3	Nährmedien	7
2.3.1	Feste Nährmedien für die Stammhaltung und Testplatten	8
2.3.2	Flüssige Nährmedien	10
2.3.2.1	Produktionsmedien	10
2.3.2.2	Medien zur Protoplastierung	10
2.3.2.3	Medien für Teststämme	11
2.3.2.3.1	Flüssigkulturen	11
2.3.2.3.2	Medien für den Verdünnungsreihentest	12
2.3.2.3.3	Medium für den Differenztest mit Pichia farinosa	12
2.4.	Mikroorganismen	13
2.4.1	Produzentenstämme	13
2.4.1.1	Tü 2386	13
2.4.1.2	Tü 2480	13
2.4.2	Teststämme	13
2.5	Stammhaltung	16
2.6	Anzucht der Produktionsstämme und Fermentation	17
2.6.1	Anzucht im Kolbenmaßstab	17
2.6.2	Fermentation von Tü 2386	17
2.6.2.1	10 l Fermentation	17

2.6.2.2	10 l Fermentation mit Parameterüberwachung	18
2.6.2.3	25 l Fermentation	18
2.6.2.4	100 l Fermentation	18
2.6.2.5	200 l Fermentation	19
2.6.3	Fermentation von Tü 2480	19
2.6.3.1	10 l Fermentation	19
2.6.3.2	100 l Fermentation	20
2.6.4	Fermentationsanalyse	20
2.6.4.1	Aktivität	21
2.6.4.2	pH-Wert der Kultur	21
2.6.4.3	pO_2-Messung	21
2.6.4.4	Myceltrockengewicht	22
2.6.4.5	Sediment	22
2.6.4.6	Bestimmung von Mannit	22
2.6.4.7	Bestimmung der Glucosekonzentration	22
2.7	Isolierung und Aufarbeitung der erwünschten Sekundärmetabolite	23
2.7.1	Isolierung von Antimycin X	23
2.7.2	Aufreinigung der Pyridindolol-Glykoside	23
2.8	Produktionsoptimierung	24
2.8.1	Produktionsverbesserung bei Tü 2386	24
2.8.1.1	Variation der Fermentationsbedingungen	24
2.8.1.1.1	Nährlösungsoptimierung	24
2.8.1.1.2	Temperatur	24
2.8.1.1.3	Belüftung	25
2.8.1.1.4	pH-Wert	25
2.8.1.1.5	Impfmenge und Alter der Vorkultur	25

2.8.1.1.6	Klonierung des Streptomyceten	25
2.8.1.1.7	Protoplastierung	26
2.8.2	Produktionsoptimierung von Tü 2480	27
2.9	Biologische Charakterisierung	27
2.9.1	Methoden zur biologischen Charakterisierung von Tü 2386	27
2.9.1.1	Plattendiffusionstest	27
2.9.1.2	Bioautographie	27
2.9.1.3	Wirkungsspektrum	28
2.9.1.4	Verdünnungsreihentest	28
2.9.1.5	Differenztest mit Pichia farinosa	29
2.9.1.6	Test auf Antiprotozoenwirkung und auf toxische Wirkung gegen höhere Organismen	29
2.9.1.7	Prüfung auf akute Toxizität	30
2.9.2	Biologische Charakterisierung von Tü 2480	30
2.10	Physikalisch-chemische Charakterisierung	30
2.10.1	Physikalisch-chemische Charakterisierung von Antimycin X	30
2.10.1.1	Dünnschichtchromatographie	30
2.10.1.2	UV-Spektrum	31
2.10.1.3	Stabilität	31
2.10.2	Physikalisch-chemische Charakterisierung der Pyridindolol-Glykoside	31
2.10.2.1	Dünnschichtchromatographie	31
2.10.2.2	Stabilität	32
3	ERGEBNISSE der VERSUCHE mit TÜ 2386	33
3.1	Beschreibung des Produzentenstammes	33
3.2	Optimierung von Anzucht und Produktion	34
3.2.1	Nährlösungsoptimierung	35

3.2.2	pH-Wert Optimierung	36
3.2.3	Belüftung	36
3.2.4	Temperatur	37
3.2.5	Nährmediums- und Temperaturshift	37
3.2.6	Klonierung des Streptomyceten	41
3.2.7	Protoplastierung	41
3.3	Fermentation von Tü 2386	43
3.4	Isolierung und Aufreinigung von Antimycin X	47
3.5	Biologische Wirkung von Antimycin X	48
3.5.1	Wirkungsspektrum	48
3.5.2	Quantitativer Wirkvergleich zwischen Antimycin A und Antimycin X	51
3.5.3	Minimale Hemmkonzentrationen	53
3.5.4	Differenztest mit Pichia farinosa	55
3.5.5	Toxizität von Antimycin X	56
3.5.5.1	Antiprotozoentest und Toxizität auf höhere Organismen	56
3.5.5.2	Prüfung auf insektizide Wirkung	56
3.5.5.3	Akute Toxizität an Mäusen	56
3.6	Physikalisch-chemische Charakterisierung von Antimycin X	57
3.6.1	Dünnschichtchromatographischer Nachweis	57
3.6.2	Löslichkeit und Stabilität	58
4	ERGEBNISSE der EXPERIMENTE mit TÜ 2480	59
4.1	Charakterisierung des Produzenten	59
4.2	Optimierung der Anzucht- und Produktions-bedingungen von Tü 2480	60
4.2.1	Nährlösungsoptimierung	60

4.2.2	Belüftung	61
4.2.3	Temperatur	61
4.3	Fermentation von Tü 2480	62
4.4	Isolierung und Aufreinigung der Pyridindolol-Glykoside	65
4.5	Physikalisch-chemische Charakterisierung der Pyridindolol-Glykoside	65
4.5.1	Dünnschichtchromatographie	65
4.5.2	Stabilität	66
4.6	Biologische Charakterisierung von Tü 2480	66
5	DISKUSSION TÜ 2386	67
5.1	Produktionsoptimierung	69
5.2	Vergleich der chemischen und physikalischen Daten von Antimycin X mit Antimycin A	74
5.3	Biologische Wirkung von Antimycin A und Antimycin X	80
5.4	Bedeutung der Antimycine	83
6	DISKUSSION TÜ 2480	86
6.1	Experimenteller Teil	86
6.2	Beschreibung der Substanzen	88
7	ZUSAMMENFASSUNG	94
8	LITERATUR	96

1 EINLEITUNG

Target - orientiertes Screening und nicht - target - bezogene Screeningmethoden: Diese beiden Möglichkeiten, nach neuen Sekundärmetaboliten zu suchen, unterscheiden sich grundsätzlich in ihrer Zielsetzung und Durchführung:

Beim klassischen Screening wird versucht, neue Stoffwechselprodukte in enger Korrelation zu einer eventuellen späteren Anwendung zu suchen. Diese auf Waksman und Woodruff zurückgehende Methode beruht darauf, durch Wachstumshemmung von Mikroorganismen als Primärtest solche Stoffe zu finden, die später als Antibiotika in der Human- und Tiermedizin zur Anwendung gelangen könnten. Durch diese Testmethoden gelang es in den letzten 30 Jahren, ca. 4000 neue, vorwiegend antibakteriell wirksame Stoffe zu isolieren (Zähner, 1977).

An Bedeutung gewinnen heute aber immer mehr auch weitere Gebiete, auf denen Sekundärmetabolite ebenfalls wirksam sein können (Zähner, 1977):

Weithin unerforscht sind noch immer Krankheiten, die durch Viren, Würmer oder Protozoen hervorgerufen werden, systemische Mykosen und Tumore. Außerhalb der Medizin können Sekundärmetabolite Anwendung finden in der Tierernährung - nutritiver Effekt von z.B. Flavomycin und Kirromycin (Wolf und Fischer, 1983)-, in der Lebensmittelkonservierung, zugelassen in Deutschland sind Nisin (Lipinska, 1977) und Pimaricin (Golding et al., 1966), und im Pflanzenschutz. Gegen Virosen und Bakteriosen konnte bisher kein wirksames Mittel gefunden werden, gegen den Befall mit Pilzen wurden in Japan das Kasugamycin (Hamada et al., 1965), die Vali-

damycine (Iwasa et al., 1971; Misato et al., 1977) und die Polyoxine (Isono und Suzuki, 1979) als Ersatz für die vorher gebräuchlichen Quecksilberverbindungen eingeführt. Als Alternative zu den umstrittenen chlorierten Kohlenwasserstoffen und Phosphorsäureestern gegen Insekten- und Milbenschädlinge wurde in Tübingen der Chitinsynthesehemmstoff Nikkomycin (Dähn et al., 1976) gefunden und in einem in vivo Screening von Merck Sharp & Dohme die Avermectine, die gleichzeitig gute anthelmintische Wirkung haben (Stapley und Woodruff, 1982).
Alle hier aufgeführten Sekundärmetabolite stammen aus Streptomycetenstämmen und zeichnen sich durch geringe Toxizität aus. Eine weitere Möglichkeit im Bereich des Pflanzenschutzes ist der Einsatz von Bacillus thuringiensis (Lüthy, 1980).

Eine Anwendungsmöglichkeit von Sekundärmetaboliten in der Technik bietet zum Beispiel die Verwendung des Ionophores Valinomycin (Brockmann und Schmidt-Kastner, 1955) für kaliumselektive Elektroden.
Ein weiterer wichtiger Punkt ist der Einsatz von Sekundärmetaboliten als biochemische Werkzeuge. So dienen z.B. spezifische Enzyminhibitoren zur Aufklärung metabolischer Reaktionsketten und der Beschaffenheit der reaktiven Zentren der Enzyme (Lardy et al., 1958; Walter et al., 1967); Penicillin wird verwendet zum Studium der Morphogenese des Mureinsacculus (Schwarz et al., 1969), Cycloheximid (Sisler, 1969) dient im Labor als Prototyp eines Proteinbiosynthesehemmstoffes, und Actinomycin und Puromycin können zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus Protein -anaboler Hormone verwendet werden (Korner, 1969).

Unter den bis heute bekannten Sekundärmetaboliten aus Mikroorganismen sind auch viele, die eine andere pharmakologische Wirkung als die antimikrobielle aufweisen. Als Beispiele seien hier genannt:

- Enzyminhibitoren (Demain, 1983)
- Desferrioxamin B - Desferal^{R} (Streptomyces sp.): Eisenkomplexbildner bei Eisenvergiftung, pathologischer Eisenablagerung (Keller-Schierlein et al., 1980)
- Cyclosporin A (Tolypocladium inflatum): immunsuppressiv (Demain, 1983)
- 1,3 Diphenethylharnstoff (Streptomyces sp.): antidepressiv (Woodruff, 1980)
- Pyrindicin (Streptomyces griseoflavus var.): analgetisch (Omura et al., 1974)
- Vitamin B 12 (Streptomyces griseus): gegen perniziöse Anaemie (Woodruff, 1980)
- Amicomacin (Bacillus pumilus): antiinflammatorisch und anti-ulcer (Demain, 1983)
- Dopastin (Pseudomonas sp.); Oudenon (Oudemansiella radicata): blutdrucksenkend (Demain, 1983)
- Ascofuranon (Ascochyta viciae): lipidsenkend (Demain, 1983)
- Zearalenon (Gibberella zeae): östrogen, anabol (Demain, 1983)
- Mutterkornalkaloide (Claviceps purpurea): oxytocisch, α-sympatholytisch, Reduzierung der Prolaktinbildung, anti-Tumor, anti-Parkinson (Cassady und Floss, 1977; Wagner, 1980)

Diese "Öffnung" der Sekundärmetabolite auch zu anderen Anwendungsgebieten hin und die sinkende Wahrscheinlichkeit, durch klassisches Screening noch unbekannte Antibiotika zu finden, führen zu der Notwendigkeit, die Suche nach neuen Stoffen

schrittweise vom Blickwinkel der späteren Verwendung zu lösen, bis hin zum nicht-target orientierten Screening, bei dem der Primärtest mit einer möglichen Anwendung in keiner Weise mehr korreliert ist (Zähner, 1977). Das Aufstellen von neuen Screeningmodellen kann an verschiedenen Punkten ansetzen:

Screeningmethoden	Erzielte Erfolge
A) Antimikrobielle Tests	
- Verwendung supersensitiver Mutanten	- Auffinden völlig neuer ß-Lactame wie z.B. Thienamycin, Clavulansäure
- Suche nach Engspektrumantibiotika	- Tetracenomycin C, Brevienomycine
- Verwendung permeationsgeschädigter Testkeime bzw. Zusatz von EDTA zur Permeabilitätsverbesserung	- Ethericine
B) Tests auf andere biologische Aktivitäten als Wachstumshemmung	
- abnormes Hyphenwachstum	- Boromycin, Venturicidin, Ansatrienine
- Hemmung der Zygosporenbildung	- Thraustomycin, Nikkomycine
C) Zellfreie Testsysteme	
- der Proteinbiosynthese	- Inhibitoren
- der Zellwandsynthese	- neue ß-Lactame
D) Chemische Testsysteme	
- chemisches Screening mit DC, HPLC	- Ketalin, Streptazolin, Desferri-Ferrithiocin

Tab. 1-1: Neuere Screeningmodelle und bisher damit gefundene neue Substanzen nach Zähner et al. (1977; 1982)

In der vorliegenden Arbeit wurden nun zwei Streptomycetenstämme mit Hilfe verschiedener Screeningmethoden untersucht:

Tü 2386 wurde im klassischen Screening auf antifungische Aktivität getestet. Das hierbei gefundene Stoffwechselprodukt wird im folgenden als Antimycin X bezeichnet.

Tü 2480 wurde dem in Tübingen entwickelten chemischen Screening (Drautz und Zähner, 1981) unterzogen. Ziel hierbei ist es, Substanzen, die durch chemische Reaktionen in der Dünnschichtchromatographie, durch Fluoreszenz oder ihre Eigenfarbe auffallen, zu isolieren und erst die chemisch reinen, neuartigen Stoffe einem breiten biologischen und pharmakologischen Test zu unterziehen. Eine der auf diese Weise aus Tü 2480 isolierten Substanzen ist identisch mit dem 1975 von Aoyagi et al. beschriebenen Pyridindolol, bei den anderen handelt es sich um bisher nicht bekannte Glykoside des Pyridindolols.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun versucht werden, die neu gefundenen Sekundärmetabolite zu isolieren, genügend Material für die Strukturaufklärung und zur Gewinnung von Reinsubstanz zur Verfügung zu stellen und im Rahmen unserer Möglichkeiten eine erste biologische Charakterisierung durchzuführen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Sofern nachstehend nicht aufgeführt, wurden Chemikalien der Firma E. Merck, Darmstadt, in der jeweils reinsten Form verwendet.

Antimycin A	Boehringer Mannheim GmbH
Amberlite XAD-2 und XAD-4	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto Corn Meal Agar	Difco Laboratories
Bacto Nutrient Broth	Difco Laboratories
Celit	Schenk Filterbau, Schwäbisch Gmünd
Cerelose	Deutsche Maizenawerke, Hamburg
Diaion HP 50	Mitsubishi, Düsseldorf
Ferrioxamin	Ciba-Geigy, Basel
Fleischextrakt (Ox Lab Lemco)	Oxoid Deutschland, Wesel
D-Glucose (Dextro m^{R})	Maizena Diät GmbH, Heilbronn
Hefeextrakt	Oxoid Deutschland
Lösungsmittel (technisch)	Herkommer und Bangerter, Stuttgart
Malzextrakt	Oxoid Deutschland
Mannit	Deutsche Maizenawerke
Polyol PRG 2025	BP Chemicals, Belgium
SDS	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Sephadex LH 20	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Sojamehl	Henselwerke Schoenenberger, Magstadt
TES	Sigma Chemical Company, St. Louis, USA
Tween 80	Caesar & Lorenz, Hilden

2.2 Verwendete Materialien und Geräte

Filterrondellen und Rundfilter	Macherey-Nagel & Co., Düren
Petrischalen (94 x 16 mm)	Multimed-Wicker und Löscher GmbH, Kirchheim/Teck
DC Platten	DC Alufolien Kieselgel 60 F 254 Schichtdicke 0,2 mm; E. Merck, Darmstadt

Kieselgel für die Säulenchromatographie	Kieselgel 60; Korngröße 0,04-0,063 mm, 230-400 mesh ASTM
pH-Elektrode Typ 465-VT	Ingold, Urdorf-Zürich, Schweiz
Sauerstoffelektrode IL 531	Ingold
Biostat S-Fermenter Typ 880052	Braun Melsungen AG
Fermenter, 10 l	New Brunswick Scientific Co, New Brunswick, N.J., USA
Fermenter, 25 l	Giovanola Frères S.A., Monthey, Schweiz
Fermenter, 100 l	Fermacell Fermentor New Brunswick
Fermenter, 200 l	Giovanola Frères S.A
Schüttelmaschinen	Infors AG, Basel, Schweiz
Schüttelwasserbäder	Gyrotory Water Bath Shaker New Brunswick Scientific Co
Filterpresse	Schenk Filterbau, Schwäbisch Gmünd
pH-Meter	Beckman Mod. 3500 digital
UV-Lampe	Universal UV Lampe CAMAG
Zentrifugen:	
Cryofuge 6-6	Heraeus Christ GmbH, Osterode
Sorvall Superspeed RC 2-B	Du Pont Instruments, Bad Nauheim
Eppendorf Zentrifuge 3200	Bachofer, Reutlingen
Rotationsverdampfer	Büchi, Flawil, Schweiz Bühler, Tübingen
Photometer	Eppendorf
UV Spektrometer	Spektralphotometer DB-GT, Beckmann

2.3 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden nach Einstellen des pH-Wertes 20 min bei 121 °C sterilisiert. Die angegebenen pH-Werte sind die vor dem Autoklavieren gemessenen Werte, der pH-Wert sank durch die Dampfdrucksterilisation um ca 0,3 Einheiten, bei Großfermentationen bis zu 0,8 Einheiten. Die angegebenen Mengen beziehen sich jeweils auf 1 Liter Nährlösung.

2.3.1 Feste Nährmedien für die Stammhaltung und Testplatten

a) HA - Agar

Glucose	4,0 g
Hefeextrakt	4,0 g
Malzextrakt	10,0 g
Agar	20,0 g
Leitungswasser	
pH-Wert 7,3	

b) Ox - Agar

Fleischextrakt	10,0 g
Pepton	10,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	20,0 g
Leitungswasser	
pH-Wert 7,2	

c) MA - Agar

Malzextrakt	20,0 g
Agar	20,0 g
Leitungswasser	

d) CMA - Agar

Bacto Corn Meal Agar	17,0 g
Aqua demin.	

e) NB - Agar

Bacto Nutrient Broth	8,0 g
Agar	20,0 g
Aqua demin.	

f) R 3 Medium zur Protoplastenregeneration (modifiziert nach Shirahama et al., 1981)

Saccharose	171,0 g	KCl	0,5 g	
Glucose	10,0 g	$MgCl_2 . 6 H_2O$	8,1 g	(40 mM)
Pepton	4,0 g	$CaCl_2 . 2 H_2O$	2,2 g	(15 mM)
Hefeextrakt	4,0 g	Agar	20,0 g	
Aqua demin. ad	880,0 ml			
pH-Wert 7,2				

getrennt autoklaviert wird noch dazugegeben: (auf 1 Liter)

K_2HPO_4 (1 %)	20 ml
TES (0,25 M; pH 7,2)	100 ml

g) Medium für Clostridium pasteurianum (Cl)

Fleischextrakt	3,0 g	Ascorbinsäure	0,2 g
Malzextrakt	3,0 g	D-Glucose	5,0 g
Hefeextrakt	3,0 g	Agar	20,0 g
Pepton	20,0 g		

Aqua demin.

pH-Wert 7,0

Die Glucose wird getrennt sterilisiert.

h) Synthetisches Medium für Bakterien (SB)

D-Glucose	8,0 g	$CaCl_2$	0,2 g
Ammoniumtartrat	4,0 g	$MnSO_4$. 7 H_2O	10,0 mg
NaCl	5,0 g	Ferrioxamin	20,0 mg
K_2HPO_4	2,0 g	Agar	20,0 g
$MgSO_4$. 7 H_2O	1,0 g		

Aqua demin.

Glucose getrennt autoklaviert

g) Synthetisches Medium für Pilze (SP)

KH_2PO_4	0,5 g	Glucose	1,0 g
$MgSO_4$. 7 H_2O	0,2 g	Biotin	3,0 mg
NaCl	0,1 g	Agar	20,0 g
Natriumglutamat	1,5 g		

Aqua demin.; Glucose getrennt sterilisiert

2.3.2 Flüssige Nährmedien

2.3.2.1 Produktionsmedien

a) NL 19

Sojamehl	20,0 g
Mannit	20,0 g
Leitungswasser	
pH-Wert 7,5	

b) Produktionsmedium 2

Sojamehl	20,0 g
Glucose	10,0 g
Leitungswasser	
pH-Wert 7,5	

c) Produktionsmedium 3

Sojamehl	20,0 g
Glucose	20,0 g
Leitungswasser	
pH-Wert 7,5	

Bei Großfermentationen wurde statt Glucose Cerelose verwendet.

2.3.2.2 Medien zur Protoplastierung

a) HA variiert

Glucose	4,0 g
Hefeextrakt	4,0 g
Malzextrakt	10,0 g
Glycin	3,0 g
Leitungswasser	
pH-Wert 7,3	

b) P - Puffer (nach Okanishi et al., 1974)

Saccharose	103,0 g
K_2SO_4	0,25 g
$MgCl_2 . 6 H_2O$	2,03 g
Spurenelementlösung	2,0 ml
Aqua demin. ad	800 ml

es wurden noch steril hinzugefügt:

KH_2PO_4 (0,5 %)	10 ml
$CaCl_2 . 2 H_2O$ (3,68 %)	100 ml
TES (0,25 M; pH 7,2)	100 ml

Zusammensetzung der Spurenelementlösung:

$ZnCl_2$	40 mg
$FeCl_3 . 6 H_2O$	200 mg
$CuCl_2 . 2 H_2O$	10 mg
$MnCl_2 . 4 H_2O$	10 mg
$Na_2B_4O_7 . 10 H_2O$	10 mg
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} . 4 H_2O$	10 mg
Aqua demin.	1000 ml

2.3.2.3 Medien für Teststämme

2.3.2.3.1 Flüssigkulturen

Für Flüssigkulturen der Teststämme wurden die in 2.4.2 angegebenen Medien ohne Agarzusatz verwendet.

2.3.2.3.2 Medien für den Verdünnungsreihentest

a) Medium für Bacillus cereus, Bacillus megaterium

NA - Medium

Fleischextrakt	3,0 g
Pepton	5,0 g
NaCl	2,5 g
Leitungswasser	
pH-Wert 7,5	

b) Medium für Mucor miehei

NB - Medium (verändert nach Matthaei et al., 1972)

Nutrient Broth	8,0 g
NaCl	5,0 g
Leitungswasser	
pH-Wert 7,2	

c) Medium für die restlichen Organismen

P - Medium (verändert nach Kavanagh, 1963)

Glucose	10,0 g	$MgSO_4 . 7 H_2O$	0,5 g
Pepton	2,0 g	Thiamin	5,0 mg
KH_2PO_4	1,5 g		
Leitungswasser			

2.3.2.3.3 Medium für den Differenztest mit Pichia farinosa

$(NH_4)_2SO_4$	2,0 g	$ZnSO_4 . 7 H_2O$	3,0 mg
$(NH_4)_2HPO_4$	0,64 g	$MnSO_4 . 2 H_2O$	3,5 mg
KCl	0,3 g	Biotin	0,01 mg
$MgSO_4 . 7 H_2O$	0,15 g	m-Inosit	20,0 mg

$CaCl_2 . 2 H_2O$	94,0 mg	Ca-Pantothenat	10,0 mg
$CuSO_4 . 5 H_2O$	0,78 mg	Thiamin-HCl	2,0 mg
$FeCl_3 . 6 H_2O$	4,8 mg	Pyridoxin	0,5 mg

Aqua demin.

außerdem: Glucose 10,0 g oder

Natriumacetat 8,0 g

Zur Verfestigung werden jeweils 1,5 % Agar zugesetzt.

2.4 Mikroorganismen

2.4.1 Produzentenstämme

2.4.1.1 Tü 2386

Der Streptomycet Tü 2386 stammt aus einer Bodenprobe, die 1980 dem sandigen Zugang der Ellora Höhle 16 in Indien entnommen wurde. Es handelt sich wahrscheinlich um Streptomyces azureus.

2.4.1.2 Tü 2480

Tü 2480 wurde ebenfalls 1980 aus einer Bodenprobe von Palmenerde in Phacet, Süd-Thailand isoliert. Dieser Stamm ist wahrscheinlich Streptomyces violaceoniger ssp. erumpens.

2.4.2 Teststämme

Die verwendeten Testorganismen sind aus den Stammsammlungen der Lehrstühle Mikrobiologie I und II.

Organismen	Temperatur (°C)	Nährmedium
I BAKTERIEN		
EUBAKTERIEN		
Achromobacter geminiani	27	HA
Arthrobacter aurescens	27	HA
Arthrobacter crystallopoietes	27	NB
Bacillus brevis ATCC 9999	37	HA
Bacillus cereus ATCC 6464	37	HA
Bacillus megaterium ATCC 14581	37	NA
Bacillus pumilus	37	NB
Bacillus subtilis ATCC 6051	37	Ox, SB
Bacillus subtilis A 14 (Mutante)	37	Ox
Bacillus subtilis F 24-2 (Mutante)	37	Ox
Brevibacterium sterolicum	27	HA
Clostridium pasteurianum	30	Cl
Corynebacterium insidiosum	27	NB
Corynebacterium rathayi W 25	27	NB
Escherichia coli K 12	37	HA, SB
Micrococcus luteus	27	NB
Micrococcus roseus	27	NB
Proteus mirabilis W 53	37	NB
Proteus vulgaris	37	NB
Pseudomonas aeruginosa	27	NB
Pseudomonas fluorescens	27	NB
Sarcina lutea	37	NB
Staphylococcus aureus Tü 202	37	Ox

Staphylococcus aureus (Penicillin-resistent)	37	Ox
ACTINOMYCETEN		
Streptomyces glaucescens Tü 49	37	HA
Streptomyces phaeochromogenes Tü 4	37	HA
Streptomyces viridochromogenes Tü 57	37	HA
II PILZE		
PILZÄHNLICHE PROTOCTISTA		
Pythium debaryanum	24	CMA
Saprolegnia asterophora	24	MA
FUNGI		
Alternaria mali (Polyoxin-sensitiv)	27	CMA
Alternaria mali (Polyoxin-resistent)	27	CMA
Aspergillus niger ATCC 16404	37	HA
Aspergillus panamensis	27	HA
Aspergillus terreus	27	HA
Botrytis cinerea Tü 157	24	MA
Candida albicans	27	HA
Candida guilliermondii CBS 6021	27	HA
Candida membranaefaciens	27	HA
Coprinus cinereus	37	HA
Dipodascus magnusii	27	HA
Hansenula anomala Tü 279	27	HA
Hansenula minuta DSM 70274	27	HA
Lipomyces lipofer	27	HA
Mucor hiemalis +/- Tü 179/180	24	HA

Mucor miehei Tü 284	37	HA, SP
Mycotypha africana Tü 260	27	HA
Nadsonia fulvescens Tü 561	27	HA
Paecilomyces variotii Tü 137	37	HA, SP
Penicillium puberulum Tü 8006	27	HA
Pichia farinosa Tü 291	27	HA
Piricularia oryzae	27	HA
Rhizoctonia solani	27	MA
Rhodotorula rubra	27	HA
Saccharomyces cerevisiae Tü 125	27	HA
Saccharomyces cerevisiae FL 200 (Mutante)	27	HA
Saccharomyces cerevisiae FL 599-1B (Mutante)	27	HA
Saccharomycopsis lipolytica CBS 599	27	HA
Schizosaccharomyces pombe Tü 251	27	HA
Trichophyton mentagrophytes Tü 510	27	HA
Wingea robertsii DSM 70870	27	HA

Tab. 2-1: Verwendete Testorganismen mit ihren Inkubationstemperaturen und Nährmedien

2.5 Stammhaltung

a) Die Produktionsstämme wurden auf HA-Schrägagarröhrchen mit 7,5 ml Inhalt überimpft, bei 27 °C bis zur vollständigen Sporulation inkubiert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt.

b) Die Teststämme wurden ebenfalls auf Schrägagarröhrchen auf den unter 2.4.2 angegebenen Medien bei den entsprechenden Temperaturen angezogen und bei 4 °C aufbewahrt.

2.6 Anzucht der Produktionsstämme und Fermentation

2.6.1 Anzucht im Kolbenmaßstab

500 ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane und 100 ml Nährlösung wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert, mit je 1 Impföse von gut sporulierten Schrägröhrchen beimpft und bei 27 °C auf einer rotierenden Schüttelmaschine mit 120 U/min inkubiert.

2.6.2 Fermentation von Tü 2386

Der Antimycin X-Produzent Tü 2386 wurde im 10 l, 25 l, 100 l und 200 l Maßstab fermentiert.

2.6.2.1 10 l Fermentation

Der Fermenter mit 9 l Nährlösung wurde 30 min bei 134 °C ex situ autoklaviert. Angeimpft wurde mit den Kulturen aus 10 Erlenmeyerkolben, die unter den Bedingungen von 2.6.1 bei Temperaturen von 27, 35 oder 37 °C 20 - 24 h gewachsen waren.

Fermentationsbedingungen: Temperatur: 27 °C
Belüftung: 0,4 vvm
240 U/min

Zur Schaumbekämpfung wurden von vornherein 2 ml Polyol zugegeben und weiteres Polyol, wenn nötig, während der Fermentation steril hinzugefügt.

Geerntet wurde nach 96 h.

2.6.2.2 10 l Fermentation mit Parameterüberwachung

Eine Überwachung der Fermentationsparameter im 10 l Maßstab war im Biostat S möglich, der ebenfalls mit einem Blattrührsystem ausgerüstet ist.

Fermentationsbedingungen:

Gesamtinhalt: 8,3 l

Inoculum: 0,83 l einer ca 22 h alten Vorkultur von 37 °C

Temperatur: 27 °C

Belüftung: 0,4 vvm

240 U/min

Hierbei konnten, ähnlich wie beim 25 l Fermenter, der pH- und der pO_2-Wert kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet werden.

2.6.2.3 25 l Fermentation

Bei dem 25 l Fermenter handelt es sich um einen Umwurffermenter. Er wurde mit 22,5 l Nährlösung in situ 30 min bei 121 °C sterilisiert und mit 2,5 l aus 20 - 48 h alten Kolbenvorkulturen von 27 und 37 °C angeimpft.

Fermentationsbedingungen:

Temperatur: 27 °C

Belüftung: 0,4 vvm

800 U/min

Antischaum: 3 ml Polyol

2.6.2.4 100 l Fermentation

Der 100 l Fermenter mit Blattrührsystem wurde mit 90 l Nährlösung 20 min in situ bei 121 °C sterilisiert. Als Inoculum diente ein 10 l Fermenter, der unter den Bedingungen von 2.6.2.1 etwa 24 h

bei 27 °C lief.

Fermentationsbedingungen : Temperatur: 27 °C

Belüftung: 0,4 vvm

200 U/min

Antischaum: 5 - 8 ml Polyol
und weiteres nach Bedarf

Die Ernte erfolgte nach 66 - 96 Stunden.

2.6.2.5 200 l Fermentation

Beim 200 l Fermenter (Umwurfsystem) wurden nach in situ Sterilisation 180 l Nährlösung mit einem 20 l Vorfermenter angeimpft. (Bedingungen der Vorkultur siehe 2.6.2.3; Alter 24 h)

Fermentationsbedingungen: Temperatur: 27 °C

Belüftung: 0,4 vvm

800 U/min

Der Fermenter wurde nach 46 Stunden geerntet.

2.6.3 Fermentation von Tü 2480

Tü 2480 wurde im 10 l und 100 l Maßstab fermentiert.

2.6.3.1 10 l Fermentation

Die 10 l Fermentation erfolgte wie unter 2.6.2.1 beschrieben.

Fermentaionsbedingungen: Temperatur: 27 °C

Belüftung: 0,4 vvm

240 U/min

Inoculum: 1 l einer 24 h alten Vorkultur (27-37 °C)

Geerntet wurde der Fermenter nach 96 Stunden.

Da die Fermentation sehr stark schäumte, wurden vor dem Autoklavieren 3 ml Polyol zugegeben und während der Fermentationen nach Bedarf noch bis zu 5 ml.

2.6.3.2 100 l Fermentation

Die Durchführung erfolgte wie unter 2.6.2.4 beschrieben.

Fermentationsbedingungen: Temperatur: 27 °C

Belüftung: 0,4 vvm

200 U/min

Angeimpft wurde mit einem 24 h alten 10 l Vorfermenter (27 °C), die Kolbenvorkulturen hierzu wurden bei 35 °C ca. 21 h lang inkubiert.

Die Ernte erfolgte nach 96 h.

Wegen des starken Schäumens wurden der 100 l Fermentation von Anfang an 15 ml Polyol und 5 ml Silikonöl zugesetzt und während der Fermentation nach Bedarf noch Polyol und Silikonöl automatisch zugegeben.

2.6.4 Fermentationsanalyse

Während der Fermentationen wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und folgende Parameter bestimmt:

2.6.4.1 Aktivität

Die Produktion, das heißt, das Ausmaß der Bildung der erwünschten Sekundärmetabolite wurde mittels Plattendiffusionstest beziehungsweise Dünnschichtchromatographie erfaßt.

Tü 2386:
Bei Tü 2386 erfolgte der Nachweis über die biologische Aktivität. Testkeim des Plattendiffusionstestes war dabei Mucor miehei. Die Durchführung ist unter 2.9.1.1 beschrieben.

Tü 2480:
Die Produktion von Tü 2480 wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Dazu wurde 1 ml der Kultur abzentrifugiert und 10 µl des Überstandes wie unter 2.10.2.1 beschrieben im DC getestet.

2.6.4.2 pH-Wert der Kultur

Der pH-Wert der Kultur wurde mittels eines laborüblichen pH-Meters bestimmt oder, sofern möglich, über eine in situ sterilisierbare Elektrode gemessen.

2.6.4.3 pO_2-Messung

Im Biostat S und im 25 l Fermenter konnte der Sauerstoffpartialdruck in der Kultur kontinuierlich mit einer in situ sterilisierbaren Sauerstoffelektrode gemessen und über einen Schreiber aufgezeichnet werden.

2.6.4.4 Myceltrockengewicht

5 ml Kultur wurden sofort nach der Probenentnahme über eine Nutsche abgesaugt. Der auf dem Filter (4,5 cm Durchmesser) verbliebene Rückstand wurde über Nacht bei 100 °C getrocknet und nach 60 min Temperaturausgleich auf der Analysenwaage gewogen. Mit den leeren Filtern war zuvor entsprechend verfahren worden.

2.6.4.5 Sediment

10 ml Kulturbrühe wurden in graduierten Gläsern 15 min lang bei 3000 U/min zentrifugiert und die Menge an abgesetztem Sediment in % angegeben.

2.6.4.6 Bestimmung von Mannit

Die Menge des im Kulturfiltrat verbliebenen Mannits wurde mittels der Chromotropsäurereaktion nach Auterhoff und Lohmann (1957) bestimmt. Die genaue Durchführung ist bei Dehler (1979) beschrieben.

2.6.4.7 Bestimmung der Glucosekonzentration

Die Glucosekonzentration im Kulturfiltrat wurde nach der Gluc-DH^{R}-Methode mit Hilfe des Merckotest^{R}-Glucose bestimmt.

2.7 Isolierung und Aufarbeitung der erwünschten Sekundärmetabolite

2.7.1 Isolierung von Antimycin X

Mit Hilfe einer Filterpresse wurde unter Zusatz von 2 % Celit das Mycel vom Kulturfiltrat abgetrennt. Das Kulturfiltrat wurde 4 mal mit Essigester extrahiert und das Eluat am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft. Das Mycel wurde 4 mal mit Aceton / Methanol extrahiert und der nach dem Einengen verbliebene wässrige Rückstand in kleinen Portionen mit Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten Essigesterextrakte wurden über eine Kieselgel-60-Säule mit Chloroform als Elutionsmittel gegeben. Die hieraus gewonnenen aktiven Fraktionen wurden einrotiert und durch Gelfiltration an Sephadex LH 20 mit Chloroform weiter aufgereinigt. Das so erhaltene, zum Teil schon kristalline Produkt beziehungsweise die Essigester-Rohprodukte wurden zur weiteren Bearbeitung an das Organisch-Chemische Laboratorium der ETH Zürich, Prof. Dr. Keller-Schierlein geschickt.

2.7.2 Aufreinigung der Pyridindolol-Glykoside

Die Kulturbrühe von Tü 2480 wurde ebenfalls mit einer Filterpresse unter Zusatz von 2 % Celit abgepreßt und das Filtrat über eine Amberlite XAD-4 Säule gegeben. Nach Waschen mit Wasser erfolgte die Elution mit Methanol. Das Mycel wurde 5 mal mit Methanol extrahiert und der wässrige Rückstand ebenfalls über Amberlite XAD-4 / Methanol gegeben.

Die weitere Aufreinigung der einrotierten Methanolextrakte erfolgte über eine Kieselgel-60-Säule mit Chloroform / Methanol-Gradientenelution. Die Pyridindolol-Glykoside befanden sich in der reinen Methanolfraktion. Auch hier erfolgte die weitere Bearbeitung in Zürich bei Herrn Prof. Dr. Keller-Schierlein.

2.8 Produktionsoptimierung

2.8.1 Produktionsverbesserung bei Tü 2386

2.8.1.1 Variation der Fermentationsbedingungen

Die Versuche erfolgten unter den normalen Anzuchtbedingungen (2.6.1). Getestet wurden jeweils das Wachstum des Streptomyceten sowie seine biologische Aktivität über einen Zeitraum von 6 - 8 Tagen.

2.8.1.1.1 Nährlösungsoptimierung

Zum Auffinden der besten Nährlösung wurden verschiedene im Hause gebräuchliche Nährmedien getestet und die optimale Nährlösung schließlich durch Variation von NL 19 gefunden.

2.8.1.1.2 Temperatur

Die Bestimmung des Temperaturoptimums erfolgte in 500 ml Erlenmeyerkolben in Schüttelwasserbädern mit unterschiedlichen Temperaturen. Die Bestimmung mit einem temperature gradient incubator war nicht möglich, da der Stamm unter diesen Bedingungen nicht

wuchs.

2.8.1.1.3 Belüftung

Die optimale Belüftungsrate wurde durch Anzucht des Stammes in 500 ml Erlenmeyerkolben mit 0 - 4 Schikanen und Füllmengen von 50 - 200 ml Nährlösung ermittelt.

2.8.1.1.4 pH-Wert

Der beste pH-Wert für Wachstum und Produktion wurde durch Einstellen verschiedener pH-Werte vor dem Autoklavieren ermittelt.

2.8.1.1.5 Impfmenge und Alter der Vorkultur

In Kolbenversuchen wurden Nährlösungszusammensetzung, Alter und Menge an Inoculum zur Erreichung möglichst optimaler Produktionsmengen herausgefunden.

2.8.1.1.6 Klonierung des Streptomyceten

Gut sporulierte Schrägröhrchen von Tü 2386 wurden mit Saline, der auf 100 ml ein Tropfen Tween 80 zugesetzt war, abgeschwemmt und der Rückstand nach Abzentrifugieren erneut in Saline aufgenommen. Waschen oder eine Zerschlagung eventuell vorhandener Sporenketten konnte nicht durchgeführt werden, da sonst kein Auskeimen der Sporen mehr erreicht wurde. Die Sporensuspension wurde in Zehnerschritten verdünnt, jeweils 0,1 ml auf HA-Platten ausgestrichen und bei 27 °C inkubiert.
Erhaltene Einzelkolonien wurden im Raster auf frische HA-Platten

ausgestrichen, ca 70 Stunden inkubiert und unter den üblichen Bedingungen mit 100 ml Erlenmeyerkolben (20 ml Inhalt) in Flüssigkultur getestet.

2.8.1.1.7 Protoplastierung

Zur Gewinnung von Protoplasten wurde der Stamm 4 Tage in 100 ml HA-Medium, dem 0,3 % Glycin zugesetzt waren, bei 27 °C auf der rotierenden Schüttelmaschine kultiviert. Nach Abzentrifugieren (10 min bei 3000 U/min) wurde der Rückstand zweimal mit P-Puffer gewaschen und das Sediment in Lysozymlösung (1 mg Lysozym / ml P-Puffer; sterilfiltriert; auf 0,1 g Naßgewicht der Zellen) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension bis zur vollständigen Protoplastierung (mikroskopische Kontrolle) 105 min auf der rotierenden Schüttelmaschine bei 27 °C inkubiert. Die Protoplastensuspension wurde steril über Glaswolle filtriert, 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert und einmal mit P-Puffer gewaschen. Der in 10 ml P-Puffer wiederaufgenommene Rückstand wurde gut durchmischt, Verdünnungsstufen in 0,5 M Saccharose hergestellt und jeweils 100 µl auf R3-Platten ausplattiert. Nach 9-tägiger Inkubation bei 27 °C wurden gewachsene Einzelkolonien auf HA-Platten neu ausgestrichen, für weitere 6 Tage bei 27 °C inkubiert und anschließend in Submerskultur Wachstum und Produktion getestet. Die Anzahl regenerierter Protoplasten ergab sich aus der Anzahl gewachsener Einzelkolonien pro Verdünnungsstufe.
Um die Anzahl nicht protoplastierter Zellen zu erfassen, wurde die Protoplastensuspension in Aqua demin. unter Zusatz von 0,05 % SDS verdünnt, von den einzelnen Stufen je 100 µl auf R3-Platten

ausgestrichen und ebenfalls bei 27 °C inkubiert.

2.8.2 Produktionsoptimierung von Tü 2480

Die Optimierung der Anzucht und Produktion von Tü 2480 erfolgte wie unter 2.8.1.1 - 2.8.1.5 beschrieben. Überwacht wurden das Wachstum und dünnschichtchromatographisch die Produktion.

2.9 Biologische Charakterisierung

2.9.1 Methoden zur biologischen Charakterisierung von Tü 2386

2.9.1.1 Plattendiffusionstest

Fermentation, Aufarbeitung, Optimierung und die Experimente zur Biologie wurden mit Hilfe des Plattendiffusionstestes (Zähner und Maas, 1972) überwacht und ausgewertet. Testkeim der laufenden Versuche war Mucor miehei - Tü 284.
Mit einer definierten Menge Sporensuspension von Tü 284 in Saline, die dem HA-Agar bei ca 40 °C zugegeben wurde, wurden Testplatten mit 10 ml Inhalt gegossen. Der Mikroorganismentiter pro Platte betrug ca 7.10^5. Filterrondellen von 6 mm Durchmesser wurden in die zu prüfenden Lösungen getaucht und auf einem Filterpapier bis zum völligen Verschwinden des Lösungsmittels getrocknet. Die Mucor - Platten wurden 16 h bei 37 °C inkubiert.

2.9.1.2 Bioautographie

Zur Korrelation zwischen Dünnschichtchromatogramm und biologi-

scher Aktivität wurden Bioautogramme, wie bei Kirst (1971) und Dorgerloh (1980) beschrieben, angefertigt oder die DC - Flecken mit einem Spatel ausgekratzt und direkt auf die Testplatten übertragen.

2.9.1.3 Wirkungsspektrum

Mit chemisch reiner, kristalliner Substanz wurden die unter 2.4.2 aufgeführten Mikroorganismen auf eventuelle Sensitivität gegenüber dem neuen Sekundärmetaboliten untersucht.
Pythium debaryanum, Saprolegnia asterophora, Alternaria mali, Botrytis cinerea, Coprinus cinereus, Piricularia oryzae und Rhizoctonia solani wurden nach Hütter (1965) als Riesenkolonien getestet, die restlichen Organismen im Plattendiffusionstest. Dazu wurden gut gewachsene Schrägröhrchen mit 3 ml Saline / Tween 80 (1 Tropfen Tween 80 / 100 ml Saline) abgeschwemmt, die Suspension in 100 ml des jeweiligen Agar (s. 2.4.2) gegeben und Platten à 10 ml gegossen. Die Substanzen wurden wie oben beschrieben aufgebracht, die Testplatten bei den angegebenen Temperaturen ca 16 h inkubiert.

2.9.1.4 Verdünnungsreihentest

Im Verdünnungsreihentest (Kavanagh, 1963; Zähner und Maas, 1972) wurde die minimale Hemmkonzentration gegen einige Organismen bestimmt:
Anzucht der Vorkulturen: 24 h in 100 ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane und 20 ml des jeweiligen Nährmediums (2.3.2.3.2), Inkubation auf der rotierenden Schüttelmaschine bei 37 ^{o}C für

Bacillus cereus, Bacillus megaterium und Mucor miehei, bei 27 °C für die restlichen Organismen.
Diese Vorkulturen wurden mit frischem Medium bei 578 nm auf eine Extinktion von 0,1 verdünnt, bzw. von Mucor miehei wurde eine Sporensuspension auf 0,1 eingestellt, da bei diesem Organismus in Vorkultur kein gleichmäßiges Wachstum zu erreichen war.
8,9 ml steriles Medium in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit 1 Schikane wurden mit je 1 ml obiger Kulturen und 0,1 ml der entsprechenden Antibiotikalösungen in Methanol versetzt und bei den jeweiligen Temperaturen auf der rotierenden Schüttelmaschine inkubiert. Als Kontrollen dienten ein Wert mit 0,1 ml reinem Methanol ohne Antibiotikazusatz und ein Wert, der unter den gleichen Bedingungen nicht inkubiert, sondern im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt wurde. Die Auswertung erfolgte nach 19,25 und 43 Stunden.

2.9.1.5 Differenztest mit Pichia farinosa

Dieser Test beruht auf dem Vermögen von Pichia farinosa, einerseits anaerob mit Glucose als C- Quelle und andererseits auch aerob unter Verwertung von Acetat zu wachsen. Der Versuch wurde wie bei Schanz (1978) beschrieben durchgeführt.

2.9.1.6 Test auf Antiprotozoenwirkung und auf toxische Wirkung gegen höhere Organismen

Der Versuch mit Dinophilus gyrociliatus und Eucoccidium dinophili ist bei Wanning (1980) und Kneer (1980) beschrieben. Für seine

Durchführung danke ich Frau Dr. L. Tejmar-Kolar.

2.9.1.7 Prüfung auf akute Toxizität

Die Prüfung auf akute Toxizität erfolgte durch intraperitoneale Injektion bei Mäusen (NMRI) und Bestimmung der LD_{50}. Der Test wurde vom Lehrstuhl Pharmakologie für Naturwissenschaftler durchgeführt.

2.9.2 Biologische Charakterisierung von Tü 2480

Zur biologischen Charakterisierung von Tü 2480 wurde nach 2.9.1.3 ein Wirkungsspektrum aufgenommen und die Antiprotozoen- bzw. toxische Wirkung wie in 2.9.1.6 geprüft.

2.10 Physikalisch - chemische Charakterisierung

2.10.1 Physikalisch - chemische Charakterisierung von Antimycin X

2.10.1.1 Dünnschichtchromatographie

Der dünnschichtchromatographische Nachweis wurde auf Kieselgel 60 F 254 Fertigplatten durchgeführt. Als Fließmittel diente Chloroform / Methanol: 92 / 8.
Die Detektion erfolgte im UV (254 und 366 nm) und durch Besprühen mit Ehrlich's Reagens:

1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd, gelöst in 75 ml Methanol und 25 ml konzentrierter Salzsäure.
Anschließendes Erwärmen der besprühten Platte auf 100 °C.

2.10.1.2 UV - Spektrum

Das UV - Spektrum der durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigten Substanz wurde mit einem Spektralphotometer DB - GT (Beckman Instr.) aufgenommen. Die Messungen wurden in Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke durchgeführt, die Substanz dazu in Methanol gelöst.

2.10.1.3 Stabilität

Die Untersuchungen über die Stabilität der Substanz wurden mit dem Kulturfiltrat bei verschiedenen pH-Werten und mit methanolischem, ethanolischem und Aceton-Mycelextrakt durchgeführt. Dazu wurden die jeweiligen Lösungen bei Temperaturen von -22 °C bis 60 °C aufbewahrt und die biologische Aktivität über einen Zeitraum bis zu 14 Tagen wie unter 2.9.1.1 beschrieben bestimmt.

2.10.2 Physikalisch - chemische Charakterisierung der Pyridindolol-Glykoside

2.10.2.1 Dünnschichtchromatographie

Die Menge an gebildeten Sekundärmetaboliten wurde bei Tü 2480 auf dünnschichtchromatographischem Wege bestimmt:
Kieselgel 60 F 254 - DC - Aluminiumfolien
Fließmittel: Essigester / Methanol / Wasser : 75 / 10 / 7,5

Detektion: Fluoreszenz im UV bei 366 nm

Es erfolgte eine halbquantitative Auswertung über Größen- und Intensitätsvergleich der bei 366 nm sichtbaren Flecke.

2.10.2.2 Stabilität

Der Stabilitätstest wurde wie unter 2.10.1.3 beschrieben durchgeführt. Der Nachweis erfolgte dünnschichtchromatographisch.

3 ERGEBNISSE DER VERSUCHE MIT TÜ 2386

3.1 Beschreibung des Produzentenstammes

Die Charakterisierung des Actinomyceten Tü 2386 erfolgte aufgrund morphologischer Merkmale nach Hütter (1967) und aufgrund der Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen sowie der Nitratreduktion nach Bergey (1974) und Nonomura (1974) mit Hilfe von Referenzstämmen. Tü 2386 weist folgende morphologische Merkmale auf:

Luftmycel:	graublau (azureus - glaucus)
Substratmycel:	braun auf HA-Medium
Sporen:	1,0 x 0,7 µm; ellipsoid
Sporenoberfläche:	glatt bis warzig, mit schollenartigen Auflagerungen
Sporenketten:	kurz, verzweigt; in offenen Schlingen (Retinaculum-Apertum, Typ Rab)
Melaninreaktion:	positiv

Diesen Merkmalen zufolge wäre der Stamm nach Hütter: Streptomyces caelestis.

Das C-Quellen-Spektrum (Tab. 3-1) dagegen spricht für Streptomyces azureus, da der Stamm im Gegensatz zu Streptomyces caelestis (Bergey 1974, Nonomura 1974) Mannit verwerten kann.

Da die Sporenketten nur sehr schlecht zu erkennen sind, kann auch der Sa - Typ mit engen Schraubenwindungen nicht ausgeschlossen werden. Dies spricht mit den übrigen Merkmalen und dem C-Quellen-

	Tü 2386	Streptom. caelestis Bergey	Streptom. caelestis Nonomura	Streptom. azureus Bergey	Streptom. azureus Nonomura
Glucose	+	+		+	
Arabinose	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+
Inosit	+	+	+	+	+
Mannit	+	-	-	+	+
Fructose	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+
Galactose	+	+		+	

Tab. 3-1: C-Quellen-Verwertung von Tü 2386 im Vergleich mit Referenzstämmen von Streptomyces caelestis und Streptomyces azureus.

Spektrum dafür, daß es sich bei Tü 2386 sehr wahrscheinlich um Streptomyces azureus handelt.

Für die Bestimmung beider Streptomycetenstämme danke ich Herrn Prof. Dr. W. Löffler herzlich.

3.2. Optimierung von Anzucht und Produktion

Die einzelnen Parameter zur Produktionsverbesserung wurden in Kolbenversuchen getestet und dann auf den Fermentationsmaßstab übertragen. Um vergleichbare Werte zu erzielen, wurden die Kolben einerseits mit einer Impföse vom Schrägröhrchen angeimpft und zum anderen zur Kontrolle mit 10 % einer 24 h alten Vorkultur.

3.2.1 Nährlösungsoptimierung

Von allen im Hause gebräuchlichen Nährmedien erwies sich Nährlösung 19 als die geeignetste. Es wurde nun versucht, durch Variation dieses Mediums die Produktion weiter zu steigern. Dazu wurde einerseits die Verwendung von fettfreiem Sojamehl erprobt, zum anderen verschiedene C-Quellen statt Mannit eingesetzt und das Verhältnis der C-Quellen zu Sojamehl variiert. Folgende Kombinationen wurden getestet:
Sojamehl fettarm / vollfett in Konzentrationen von 1 % - 4 % und Lactose, Glucose, Glycerin, Saccarose, Stärke und Mannit in Konzentrationen von 0,5 % - 5 %.
Als für das Wachstum geeignetste Variante erwies sich dabei die Kombination von 2 % Sojamehl vollfett / 2 % Mannit, d.h. Nährlösung 19. Mit 1 % und 2 % Glucose als C-Quelle dagegen wurden im Plattendiffusionstest mit Mucor miehei (2.9.1.1) größere Hemmhöfe erzielt, das Wachstum des Stammes aber war gegenüber NL 19 wesentlich verzögert und die Anzucht somit langwieriger und infektionsgefährdeter (Tab. 3-2).
Je höher also der Gehalt an Glucose, desto später erfolgt das Wachstum, aber desto höhere und längere Antibiotikaproduktion wird erreicht.

2 % Sojamehl und	25 h	49 h	73 h	96 h	7 Tage
2 % Mannit	0 +	Spur +++	20 +++	18 +++	14 +++
1 % Glucose	0 -	0 +(+)	21 +++	24 +++	17 +++
2 % Glucose	0 -	0 -	0 +(+)	21 ++(+)	25 +++

pH 7,5

Tab. 3-2: Aktivität und Wachstum von Tü 2386 auf den verschiedenen Produktionsmedien
+ = Maß für das Wachstum
Zahl = Hemmhofdurchmesser auf Tü 284 in mm

3.2.2 pH - Wert - Optimierung

In Kolbenkulturen wurden Werte von pH 4 - pH 8 vor dem Autoklavieren eingestellt und über 7 Tage Wachstum und Produktion verfolgt. pH-Werte zwischen 7 und 7,5 brachten dabei ohne wesentliche Unterschiede schnellstes Wachstum und höchste Produktion.

3.2.3 Belüftung

In Kolbenversuchen und durch Fermentationen wurde eine optimale Belüftungsrate von 0,4 vvm ermittelt. Bei Verwendung höherer Luftmengen wächst der Stamm etwas schneller, die Produktion bleibt aber konstant, gleichzeitig geht allerdings ein Teil der Kultur durch starkes Überschäumen im Fermenter verloren.

3.2.4 Temperatur

Wie unter 2.8.1.1.2 beschrieben, wurden Temperaturen von 22 °C - 37 °C auf ihren Einfluß auf Wachstum und Produktion untersucht. Bei 37 °C wuchs der Stamm am raschesten, lysierte dann aber auch wieder am schnellsten. Parallel zum Wachstum zeigte sich bei höheren Temperaturen auch früher Aktivität, die aber sehr rasch (innerhalb von 24 Stunden) wieder abnahm.
Bei 27 °C wuchs der Stamm zwar langsamer an, auf der anderen Seite wurde bei dieser Temperatur aber die höchste Menge an Antibiotikum gebildet, und die Produktion blieb über mehrere Tage stabil.

3.2.5 Nährmediums- und Temperaturshift

Da Tü 2386 ein Stamm mit vergleichsweise langsamem Wachstum ist, war es für die Fermentation wichtig, Bedingungen für schnelles Anwachsen mit denen für hohe und stabil-bleibende Produktion zu kombinieren. Im Kolbenversuch wurde deshalb aufgrund obiger Ergebnisse Alter und Temperatur der Vorkultur, Temperatur und Nährlösungszusammensetzung der Hauptkultur sowie die Menge an Impfmaterial variiert, um möglichst optimale Fermentationsbedingungen zu erreichen (Tab. 3-3 und 3-4):

Vorkultur:
- Nährlösung 19
- Alter: 20 h oder 54 h
- Temperatur: 27 °C oder 37 °C

Hauptkultur:	Nährlösung 19 oder
	Produktionsmedium 2 (1 % Glucose) oder
	Produktionsmedium 3 (2 % Glucose)
	Temperatur: 27 °C
Inoculum:	10 % oder 20 %

Aufgrund dieser Versuche wurden die Fermentationen mit Nährlösungs- und Temperaturshift nach folgendem Schema durchgeführt:

Kolbenvorkultur:	NL 19, 35 - 37 °C
10 l Vorfermenter:	Produktionsmedium 2 mit 1 % Glucose, 27 °C
100 l Fermenter:	Produktionsmedium 3 mit 2 % Glucose, 27 °C

oder, da der 10 l Vorfermenter mit einigen Klonen unter den obigen Bedingungen schon nach 20 h Aktivität aufwies:

Kolbenvorkultur:	NL 19, 35 - 37 °C
10 l Vorfermenter:	NL 19, 27 °C
100 l Fermenter:	Produktionsmedium 2 mit 1 % Glucose, 27 °C.

Die Verwendung von 20 %-igem Impfmaterial war aus Sterilitäts- und anderen technischen Gründen nicht möglich. Die Bedingungen für die übrigen Fermentationen sind unter 3.3 beschrieben.

Kolben	NL der Hauptkultur	Temp. der Vorkultur in °C	Alter der Vorkultur in h	Inoculum in %
1	19	27	20	10
2	1 G	27	20	10
3	2 G	27	20	10
4	19	27	20	20
5	1 G	27	20	20
6	2 G	27	20	20
7	19	37	20	10
8	1 G	37	20	10
9	2 G	37	20	10
10	19	37	20	20
11	1 G	37	20	20
12	2 G	37	20	20
13	19	27	54	10
14	1 G	27	54	10
15	2 G	27	54	10
16	19	27	54	20
17	1 G	27	54	20
18	2 G	27	54	20

Tab. 3-3: Variation der Anzuchtbedingungen; Auswertung siehe Tab. 3-4
1 G = Produktionsmedium 2 (1 % Glucose)
2 G = Produktionsmedium 3 (2 % Glucose)

	1 d	1,5 d	2 d	2,5 d	3 d	4 d	5 d	6 d
1	Spur	20	19	22	21	21	19	17
2	14	25	24	25	26	26	25	21
3	0	0	0	20	22	26	26	26
4	18	22	22	20	19	19	18	16
5	14	25	24	25	23	26	26	23
6	0	13	18	24	24	27	28	28
7	23	25	22	20	19	20	20	16
8	26	30	27	26	25	25	23	17
9	25	28	27	27	28	27	27	27
10	24	24	21	21	24	22	20	17
11	27	28	26	26	28	27	24	19
12	25	25	23	24	26	25	25	24

	0,5 d	1 d	1,5 d	2 d	3 d	4 d	5 d
13	0	Spur	22	24	20	19	18
14	0	0	23	25	23	24	24
15	0	0	20	23	23	25	27
16	10	16	22	24	21	18	19
17	Spur	14	23	25	24	24	24
18	Spur	12	23	23	26	26	28

Tab. 3-4: Kolbenvorversuch mit Nährlösungs- und Temperaturshift, unterschiedlichem Alter der Vorkultur und variierender Inoculum-menge. Auswertung von Tab. 3-3
Durchmesser der Hemmhöfe in mm
Meßtoleranz 1-2 mm

3.2.6 Klonierung des Streptomyceten

Die nach 2.8.1.1.6 erhaltenen Einzelkolonien wiesen in Submerskultur erhebliche Aktivitätsschwankungen auf (Abb. 3-1). Getestet wurden jeweils über 100 Einzelkolonien. Die weiteren Fermentationen wurden mit dem besten Klon durchgeführt.

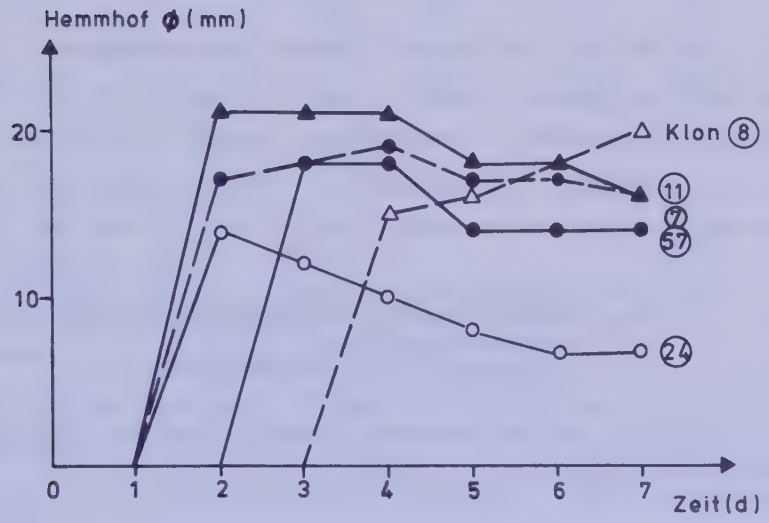


Abb. 3-1: Beispiel unterschiedlicher Produktion von verschiedenen Klonen einer Testreihe

3.2.7 Protoplastierung

Eine weitere Steigerung der Produktion sollte durch die Gewinnung und Regeneration von Protoplasten erreicht werden. Durch den Test vieler regenerierter Einzelkolonien konnten Stämme mit recht unterschiedlicher Aktivität selektiert werden (Tab. 3-5).

Nr.	Protoplast	72 h	96 h	120 h	144 h
1	27	0	0	9	20
2	19	0	0	19	27
3	42a	0	0	24,5	30
4	29a	0	0	27,5	26
5	32	0	15	10	Spur
6	38	0	15	21,5	20
7	28	0	18	23	26
8	39	0	22	20	Spur
9	34a	16	20	0	0
10	40	27	26	28	28
11	10	27,5	27	27	28
12	43	28	25,5	26	0

Tab. 3-5: Beispiele unterschiedlicher Aktivitätsmuster von durch Protoplastierung gewonnenen Kolonien
Durchmesser der Hemmhöfe in mm
Meßtoleranz 1 - 2 mm

Auch hier wurden die geeignetsten Stämme (schnelle und hohe Produktion) für weitere Fermentationen verwendet.

Bestimmung der Anzahl regenerierter Protoplasten:
Die Anzahl der Protoplasten pro ml, die eine Zellwand regenerieren, ergibt sich aus der Anzahl gewachsener Kolonien pro Verdünnungsstufe. Sie betrug hier etwa $6{,}6 \cdot 10^7$ / ml.

Bestimmung der Anzahl nicht protoplastierter Zellen:
Um die Anzahl nicht protoplastierter Zellen zu errechnen, werden Verdünnungen unter Zusatz eines Detergens angefertigt und ausplattiert. Alle Kolonien, die daraufhin wachsen, entstehen aus

nicht protoplastierten Einheiten. Bei diesem Versuch waren es 200 / ml.

3.3 Fermentation von Tü 2386

Die Fermentationen wurden wie unter 2.6.2 beschrieben durchgeführt, die Fermentationsparameter nach 2.6.4 bestimmt.

Die ersten Fermentationen und die Optimierung erfolgten im 10 l Maßstab, zur Bereitstellung größerer Mengen des Rohproduktes wurde dann auf die 100 l Fermentation übergegangen. Abb. 3-2 zeigt den Verlauf einer 10 l Fermentation, aufgenommen im Biostat S, der von den äußeren Bedingungen her mit den 10 l Fermentern vergleichbar ist.
Nährmedium dieser Fermentation war Produktionsmedium 2, Nährlösung der Kolbenvorkultur NL 19.
Der Verlauf einer 100 l Fermentation ist in Abb. 3-3 dargestellt. Nährmedium der Kolbenvorkultur und des 10 l Vorfermenters war hierbei NL 19, Medium des 100 l Fermenters Produktionsmedium 2.
Die Aktivität des 100 l Fermenters zum Zeitpunkt 0 ist dadurch zu erklären, daß der 10 l Vorfermenter beim Überimpfen schon eine Aktivität von 24 mm (Hemmhofdurchmesser auf Mucor miehei) zeigte.

Wesentlich schlechter verlief die Fermentation von Tü 2386 in den 25 l und 200 l Fermentern mit Umwurfsystem. Hier wuchs der Stamm nur sehr schlecht an, so daß die Fermentation sehr infektionsanfällig wurde und die Endausbeute an Substanz nicht über 1 mg / l lag.

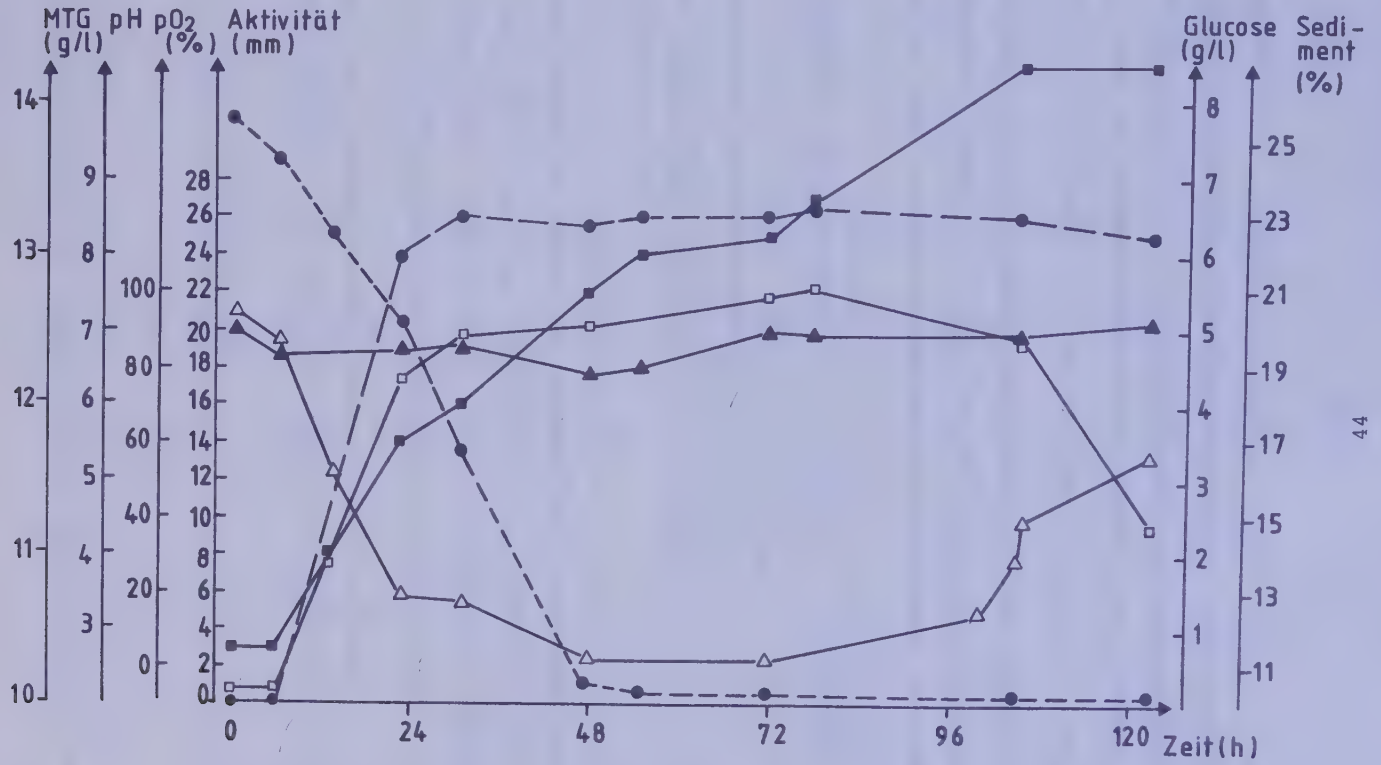


Abb. 3-2: Fermentation von Tü 2386 im 10 l Maßstab; Testorganismus Tü 284
C-Quelle 1 % Glucose
●—● Aktivität (mm Hemmhofdurchmesser), ■—■ Sediment (%), ▲—▲ pH
□—□ Myceltrockengewicht (g/l), ●···● Glucose (g/l), △—△ pO_2 (%)

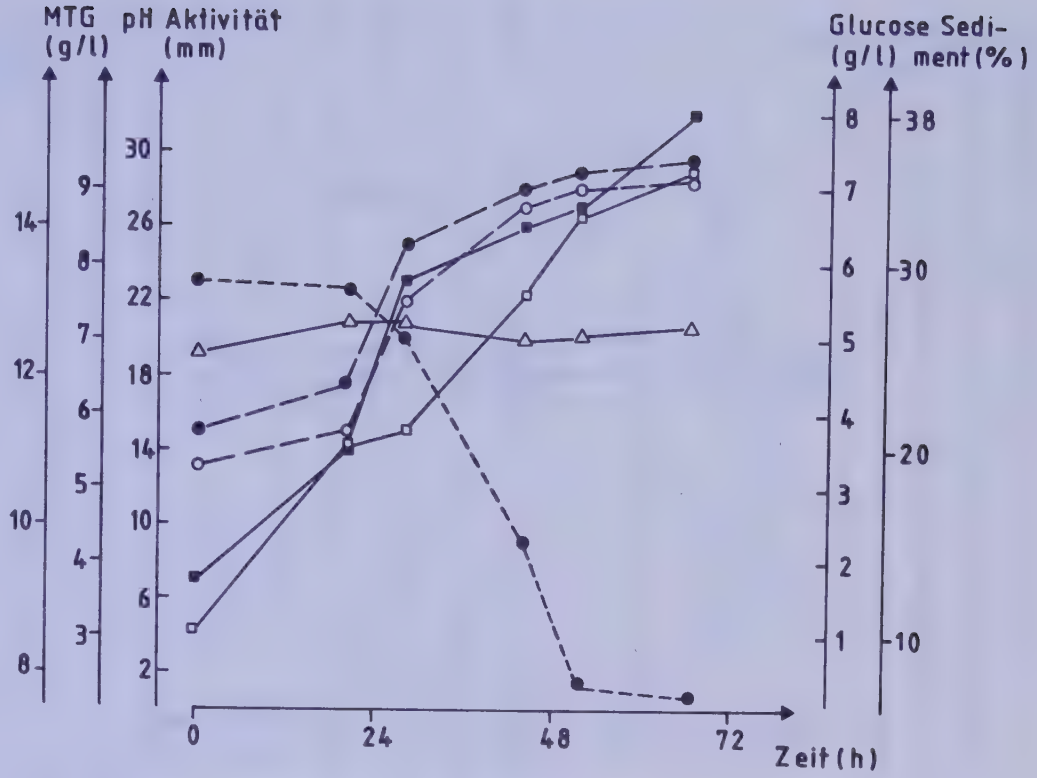


Abb. 3-3: 100 l Fermentation von Tü 2386; Testkeim Tü 284
C-Quelle 1 % Glucose
●– –● Gesamt-Aktivität (mm Hemmhofdurchmesser), ■——■ Sediment (%),
○– –○ Aktivität des Kulturfiltrates (mm Hemmhofdurchmesser), △——△ pH,
□——□ Myceltrockengewicht (g/l), ●····● Glucose (g/l)

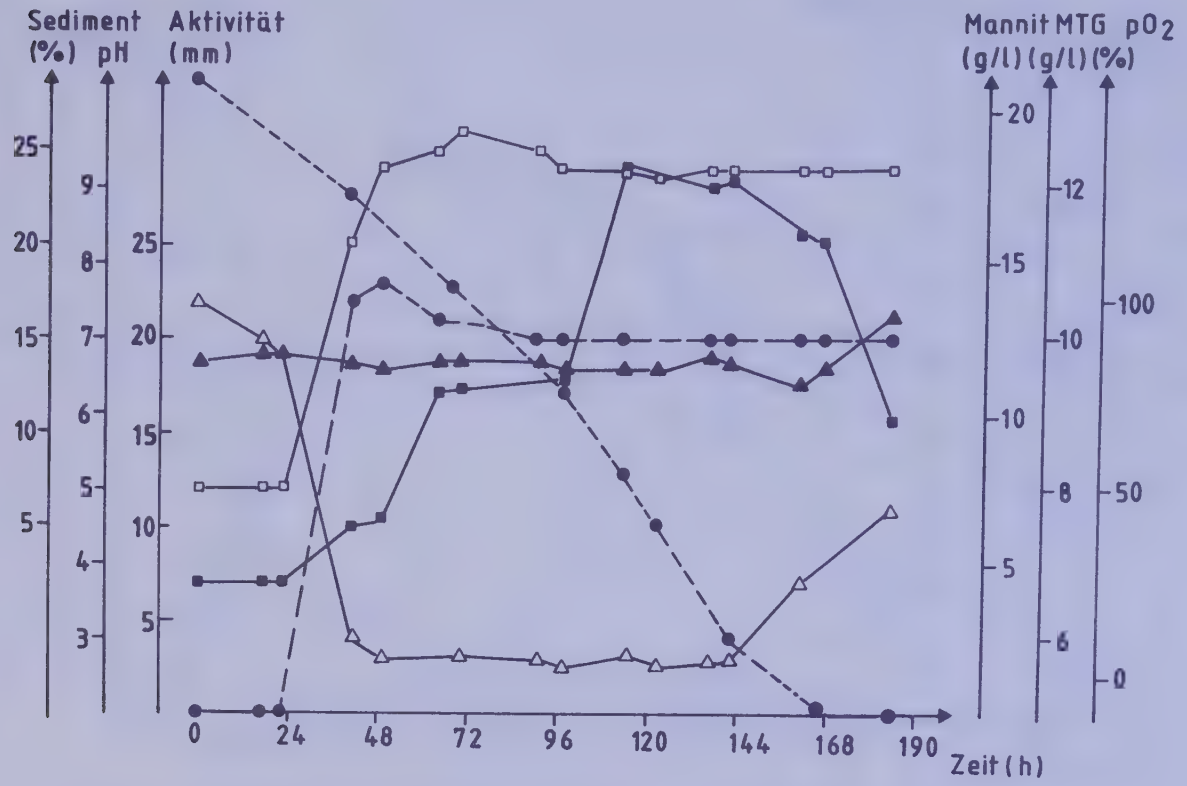


Abb. 3-4: 25 l Fermentation von Tü 2386; Testkeim Tü 284
C-Quelle 2 % Mannit
●—–● Aktivität (mm Hemmhofdurchmesser), □——□ Sediment (%), ▲——▲ pH
■——■ Myceltrockengewicht (g/l), ●- - -● Mannit (g/l), △——△ pO_2 (%)

Abb. 3-4 zeigt eine 25 l Fermentation, Nährlösung von Kolbenvorkultur und Fermenter war NL 19.

Zur Herstellung des Untersuchungsmaterials diente bei Tü 2386 also die Fermentation im 100 l Maßstab. Durch das Zusammenwirken aller Optimierungsparameter konnte die Ausbeute an Antimycin X (chemisch reine, kristalline Substanz) im Verlauf der Arbeit von ca. 0,75 mg / l auf ca. 8 mg / l gesteigert werden.

3.4 Isolierung und Aufreinigung von Antimycin X

Die Aufarbeitung der Fermentationskulturen erfolgte wie unter 2.7.1 beschrieben.

Bei der Fermentation im 100 l Maßstab wurde das Kulturfiltrat (50-60 l bei ca. 40 % Sediment) 4-5 mal mit je 12 l Essigester extrahiert, das Mycel 4-5 mal mit je 10-12 l Aceton / Methanol. Die anschließende Extraktion des wässrigen Mycelrückstandes mit Essigester erfolgte nach Verdünnen mit Wasser in kleinen Portionen, da die Substanz erst nach 3-5 maligem Ausschütteln einigermaßen quantitativ in die Essigesterphase überging.

Da sich die Substanz mit allen organischen Lösungsmitteln nur sehr schlecht ausschütteln läßt, wurden auch Aufarbeitungen bei unterschiedlichen pH-Werten über Amberlite XAD-Adsorberharze und verschiedene Diaionverbindungen untersucht. Antimycin X bindet an Diaion HP 50, allerdings nicht quantitativ, so daß hierbei die Verluste größer wären als bei einer Extraktion mit Essigester.

Nach der weiteren Aufreinigung über Kieselgel 60 / $CHCl_3$- und Sephadex LH20 / $CHCl_3$- Säulenchromatographie konnte die Substanz

zum Teil in schon kristalliner, wenn auch nicht chemisch reiner Form gewonnen werden.

3.5 Biologische Wirkung von Antimycin X

3.5.1 Wirkungsspektrum

Das Wirkungsspektrum wurde, wie in 2.9.1.3 beschrieben, mit chemisch reiner, kristalliner Substanz im Vergleich mit käuflich erworbenem Antimycin A aufgenommen.
Die Substanzen wurden dazu in Konzentrationen von 1; 0,3; 0,1 und 0,03 mg / ml in analysenreinem Methanol gelöst und in diese Lösungen die Testrondellen getaucht.

Die Spur einer Wachstumshemmung konnte für beide Substanzen auf Bacillus subtilis / Minimalmedium nachgewiesen werden. Ansonsten zeigten Antimycin A und Antimycin X in Konzentrationen bis zu 10 mg / ml keinerlei antibakterielle Wirkung, es besteht auch keine Eigenhemmung des Antibiotikums auf seinen Produzentenstamm. In Tab. 3-6 ist die Wirkung beider Substanzen auf die restlichen getesteten Organismen aufgeführt. Bemerkenswert sind die großen quantitativen Differenzen zwischen beiden Substanzen bei Mucor miehei, Hansenula anomala und Trichophyton mentagrophytes.

Wirkungsspektrum von Antimycin X im Vergleich zu Antimycin A auf Pilze:

getestete Organismen	Antimycin	Konzentrationen (mg/ml) 1	0,3	0,1	0,03
ZYGOMYCETES					
Mucor hiemalis (+/-)	A	0/17	0/15	0/13	0/11
	X	0/20	0/19,5	0/19	0/17
Mucor miehei	A	30	28	25,5	22
	X	40,5	39,5	38,5	34
Mucor miehei (Minimalmedium)	A	29,5	28	24	20,5
	X	40,5	40,5	39	35
Mycotypha africana	A	0/20	0/17	0/15	0/11
	X	0/22	0/20	0/15	Spur
ENDOMYCETES					
Dipodascus magnusii	A	0/20	0/17	0/14	0/10
	X	0/19	0/17	0/15	0/13
Hansenula anomala	A	18	15	13	10
	X	31	29,5	27,5	24,5
Hansenula minuta	A	32	30	28,5	24,5
	X	31,5	30,5	30	26,5
Nadsonia fulvescens	A	Spur	Spur	Spur	0
	X	0/12	0/10	0/9	0
Pichia farinosa	A	20,5	19,5	15,5	12
	X	15	13,5	11	0
Saccharomyces cerevisiae	A	0/36	0/35	0/32	0/28
	X	35	35	31	29
Saccharomyces cerevisiae FL 200	A	0/33	0/30	0/26	0/22
	X	0/30	0/29	0/27	0/23
Saccharomyces cerevisiae FL 599-1B	A	0/34	0/33	0/28	0/25
	X	0/31	0/30	0/28,5	0/26
Saccharomycopsis lipolytica	A	26	24	21	18
	X	30	28	27	24
Schizosaccharomyces pombe	A	28	26	21	19
	X	28	27	24	21

FUNGI IMPERFECTI (DEUTEROMYCETES)

Alternaria mali (Polyoxin-sensitiv)	A	starke Hemmung*			
	X	starke Hemmung			
Alternaria mali (Polyoxin-resistent)	A	starke Hemmung*			
	X	starke Hemmung			
Aspergillus niger	A	17/25	15/23	13/20	12/18
	X	22/30	20/28	17/25	13/21
Aspergillus panamensis	A	15	13	11	10
	X	15	13	11	10
Aspergillus terreus	A	0/13	0/11	0/9	Spur
	X	0/17	0/14	0/12	0/10
Botrytis cinerea	A	30	28	26	25
	X	30	30	28	26
Candida albicans	A	16	13	11	8
	X	17	15	14	10
Candida guilliermondii	A	0/15	0/14	0/10	0/8
	X	0/12	0/11	0/10	0
Paecilomyces variotii	A	25/35	23/33	21/30	20/26
	X	27/37	25/35	23/33	17/27
Paecilomyces variotii (Minimalmedium)	A	28	25	24	17
	X	25	25	20	16
Piricularia oryzae	A	Hemmung*, 10 x stärker als X			
	X	Hemmung			
Rhizoctonia solani	A	Spur	0	0	0
	X	Spur	0	0	0
Rhodotorula rubra	A	15	14	11	11
	X	20	19	17	11
Trichophyton mentagrophytes	A	11,5	10	8,5	Spur
	X	31,5	29,5	26,5	22,5

OOMYCETES

Pythium debaryanum	A	Hemmung*			
	X	Hemmung			
Saprolegnia asterophora	A	20	17	10	0
	X	23	21	18	Spur

BASIDIOMYCETES					
Coprinus cinereus	A	0/18	0/15	0/11	0/10
	X	Hemmung*			

*) Alternaria mali, Piricularia oryzae, Coprinus cinereus und Pythium debaryanum waren im Test an der Riesenkolonie quantitativ nur schlecht auswertbar, es war jedoch deutliche Hemmung sichtbar

Tab. 3-6: Wirkung von Antimycin A und Antimycin X auf Pilze; angegeben: mm Hemmhofdurchmesser der einzelnen Konzentrationen im Plattendiffusionstest
Sind 2 Zahlenwerte angegeben, so ist der größere das Maß eines inkompletten Hemmhofes (teilweises Wachstum)
Spur: eine gerade noch sichtbare Hemmzone um die 6 mm großen Testrondellen
Meßtoleranz 1-2 mm

Für den Vergleich der Wirkung von Antimycin A und X auf Pilze wurden Platten der gleichen Chargen verwendet, es bestehen bezüglich der Plattendicke und -dichte also nur geringfügige Unterschiede.

3.5.2 Quantitativer Wirkvergleich zwischen Antimycin A und Antimycin X

Um eine Korrelation zwischen Hemmhofdurchmesser und Menge an Antibiotikum herstellen zu können, wurden in Eichkurven der log bekannter Antibiotikakonzentrationen gegen die zugehörigen Hemmhofdurchmesser aufgetragen.
Die Abbildungen 3-5 bis 3-7 zeigen diese Dosis-Wirkungskurven für die Organismen, die im Wirkungsspektrum erhebliche Sensitivitätsunterschiede gegenüber Antimycin X im Vergleich zu Antimycin A aufwiesen.

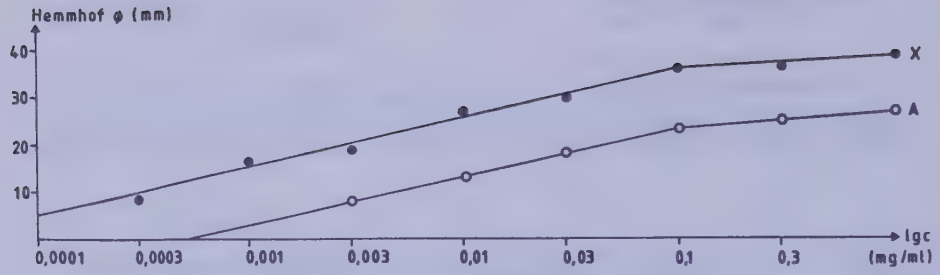


Abb. 3-5: Hemmwirkung von Antimycin X (●——●) und Antimycin A (○——○) auf Mucor miehei Hemmhofdurchmesser in mm

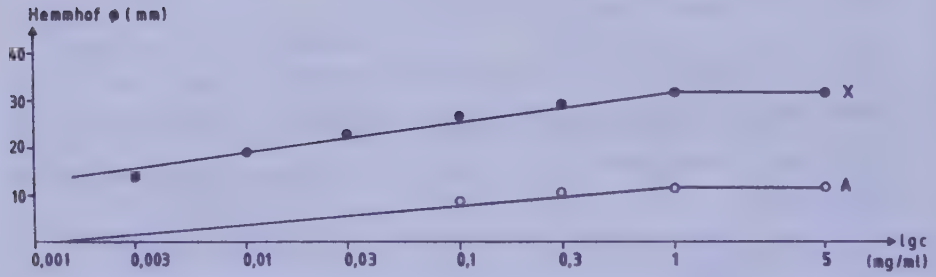


Abb. 3-6: Hemmwirkung von Antimycin X (●——●) und Antimycin A (○——○) auf Trichophyton mentagrophytes

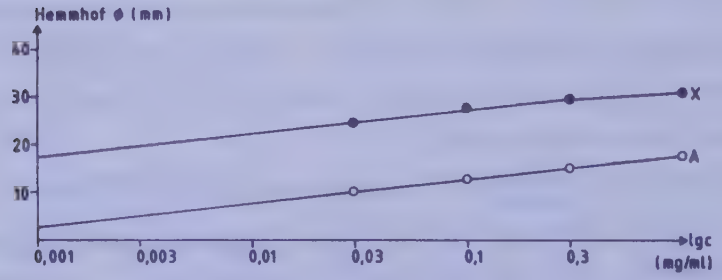


Abb. 3-7: Hemmwirkung von Antimycin X (●——●) und Antimycin A (○——○) auf Hansenula anomala

Da für eine Bilanzierung nicht genügend Reinmaterial zur Verfügung stand, sollten diese Kurven auch dazu dienen, anhand eines Standards von Antimycin A eine ungefähre Aussage über die Produktion beziehungsweise Verluste bei der Aufarbeitung von Tü 2386 machen zu können. Allerdings knicken die Kurven ab einer bestimmten Konzentration ab, da durch die Lipophilie der Substanzen keine genügende Diffusion im Agar mehr gewährleistet ist.
Geht man von Ablesefehlern von 1-2 mm und bei verschiedenen Plattenchargen doch etwas unterschiedlicher Plattendichte aus, so kann eine Fehlerquote von über einer Zehnerpotenz je nach Kurvenbereich nicht ausgeschlossen werden. Eine wirklich quantitative Fermentations- und Aufarbeitungsüberwachung war aus diesem Grunde nicht möglich.

3.5.3 Minimale Hemmkonzentrationen

Die minimalen Hemmkonzentrationen von Tü 2386 auf einige Organismen wurden im Vergleich mit Antimycin A in Flüssigkultur ermittelt (2.9.1.4).
Der Versuch mußte in Erlenmeyerkolben durchgeführt werden, da bei der sonst üblichen Inkubation in Reagenzgläsern die verwendeten Hefen wegen zu geringer Belüftung gären und somit unempfindlich gegenüber Antimycinen werden. Bei zum Vergleich in Standkulturen inkubierten Ansätzen von Pichia farinosa und Saccharomyces cerevisiae konnte bis zu Konzentrationen von 100 µg/ml Antibiotikum keine Hemmung festgestellt werden.
Ausgewertet wurde der Versuch optisch durch Trübungsvergleich der einzelnen Kolben untereinander und gegen die nicht gewachsene

Kontrolle (Wert bei 4 °C inkubiert). Die zur Lösung des Antimycins verwendete Methanolmenge wurde so gering gewählt, daß sie das Wachstum der Mikroorganismen nicht beeinflußt. Tab. 3-7 zeigt den Vergleich von Antimycin A und Antimycin X bezüglich der MHK-Werte auf einige Mikroorganismen.

Getestete Organismen	MHK-Werte (µg / ml) Antimycin X	Antimycin A
Bacillus cereus	> 150	> 150
Bacillus megaterium	> 150	> 150
Hansenula minuta	> 0,02 ≤ 0,04	> 0,04 ≤ 0,08
Saccharomycopsis lipolytica	> 0,04 ≤ 0,08	> 0,08 ≤ 0,1
Hansenula anomala	> 0,005 ≤ 0,01	> 0,1 ≤ 0,5
Mucor miehei	> 0,0008 ≤ 0,001	> 0,008 ≤ 0,01
Trichophyton mentagrophytes	> 0,05 ≤ 0,1	> 5 ≤ 10

Tab. 3-7: MHK-Werte von Antimycin A und Antimycin X bestimmt im Verdünnungsreihentest Konzentrationen in µg/ml

Wie schon im Plattendiffusionstest des Wirkungsspektrums zeigen sich auch hier für Mucor miehei, Hansenula anomala und Trichophyton mentagrophytes erhebliche Differenzen zwischen Antimycin A und Antimycin X, während Hansenula minuta und Saccharomycopsis lipolytica ungefähr gleiche Empfindlichkeit gegenüber beiden Substanzen aufweisen. Bacillus cereus und Bacillus megaterium zeigten bei Konzentrationen von 150 µg / ml der Antibiotika Wachstumsverzögerungen, konnten aber nicht vollständig gehemmt

werden.

3.5.4 Differenztest mit Pichia farinosa

Mit diesem Test sollte untersucht werden, ob Antimycin X, genauso wie Antimycin A, als Hemmstoff der Atmungskette wirkt. Die Versuchsanordnung beruht darauf, daß Pichia farinosa in Standkultur mit Glucose als C-Quelle gärt, in Schüttelkultur mit Acetat als einziger Kohlenstoffquelle dagegen atmet. Wird nun unter beiden Bedingungen ein Plattendiffusionstest durchgeführt, so ist zu erwarten, daß Hemmstoffe der Atmungskette nur die auf Acetat (Atmung) gezogenen Kulturen beeinflussen, auf Platten mit durch Gärung gewachsener Kultur aber keine Hemmung zeigen.
Getestet wurden Antimycin A, Antimycin X und Rutamycin, ein Hemmstoff der oxidativen Phosphorylierung und der ATP-ase in den Mitochondrien (Lardy et al., 1965; Walter et al., 1967).
Das Rutamycin wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Keller-Schierlein überlassen.

	Platten mit Acetat als C-Quelle	Platten mit Glucose als C-Quelle
Antimycin X (10 mg/ml)	16	0
Antimycin A (10 mg/ml)	20	Spur
Rutamycin (1 mg/ml)	10	Spur

Tab. 3-8: Wirkung von Antimycin X, Antimycin A und Rutamycin auf Pichia farinosa im Differenztest angegeben: Hemmhofdurchmesser in mm (+/-2)

Wie aus Tab. 3-8 zu ersehen ist, wirkt Antimycin X sehr wahr-

scheinlich auch als Hemmstoff der Atmungskette. Eine andere, gleichzeitig mitgetestete antifungische Substanz, Tü 2253 (Fauth, 1984), zeigte auf beiden Plattentypen annähernd gleichgroße Hemmhöfe, das Testsystem kann also zwischen Atmungskettenhemmern und antifungischen Substanzen mit anderer Wirkungsweise differenzieren.

3.5.5 Toxizität von Antimycin X

Die Toxizität von Antimycin X wurde durch Antiprotozoentest, Prüfung auf insektizide Wirkung und Bestimmung der akuten Toxizität untersucht.

3.5.5.1 Antiprotozoentest und Toxizität auf höhere Organismen

Der Test auf Antiprotozoen-Wirkung (Eucoccidium dinophili) konnte nicht durchgeführt werden, da Antimycin X in einer Konzentration von 5 µg/ml nach 7 Tagen für den Wurm Dinophilus gyrociliatus als Wirt schon toxisch war.

3.5.5.2 Prüfung auf insektizide Wirkung

Die Toxizität gegen Insekten wurde bei Herrn Prof. Holtz, Gießen, untersucht. Antimycin X zeigt ungefähr die gleiche insektizide Wirkung wie Antimycin A, genaue Werte liegen jedoch nicht vor.

3.5.5.3 Akute Toxizität an Mäusen

Zur Bestimmung der akuten Toxizität, die am Lehrstuhl Pharmakolo-

gie für Naturwissenschaftler der Universität Tübingen durchgeführt wurde, wurden Antimycin X und Antimycin A in gleicher Konzentration (1,8 - 7,5 mg/kg KG) Mäusen (NMRI-Stamm, 28-30 g) durch i.p. Injektion appliziert. Da die Substanzen in den erforderlichen Konzentrationen wasserunlöslich sind, wurden die Antimycine zunächst in wenig Methanol gelöst und durch Verdünnen mit Kochsalzlösung (0,9 %) Suspensionen hergestellt. Die Unbedenklichkeit des Methanolzusatzes wurde in einem Kontrollversuch gezeigt. Für Antimycin X ergab sich eine LD_{50} von 5,62 mg/kg Körpergewicht. Antimycin A erwies sich in allen untersuchten Konzentrationen (1,8 - 7,5 mg/kg KG) als toxisch. Die LD_{50} von Antimycin A liegt bei etwa 1,8 mg/kg Körpergewicht (Korzybski et al., 1978). Der Tod der Tiere trat nach Krämpfen wahrscheinlich durch Atemlähmung innerhalb von 2 Stunden ein.

3.6 Physikalisch-chemische Charakterisierung von Antimycin X

3.6.1 Dünnschichtchromatographischer Nachweis

Durch Bioautographie (2.9.1.2) konnte der biologischen Aktivität ein Fleck im DC zugewiesen werden. Er ist auf Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator sichtbar im UV durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm sowie durch helle Eigenfluoreszenz bei 366 nm. Nach Besprühen mit Ehrlich's Reagens färbt er sich beim Erwärmen gelb/orange.

Die gleichen qualitativen Eigenschaften zeigt auch Antimycin A, allerdings weisen beide Substanzen unterschiedliche Rf-Werte auf:

Fließmittel	Antimycin A	Antimycin X
Chloroform/Methanol 92 : 8	0,64	0,56
Chloroform/Methanol 19 : 1	0,64	0,53
Chloroform/Essigester 4 : 1	0,34	0,28

Tab. 3-9: Rf-Werte von Antimycin X und Antimycin A in verschiedenen Fließmittelgemischen bei Chromatographie an Kieselgel 60 F 254 DC-Alufolien

3.6.2 Löslichkeit und Stabilität

Die Substanz ist gut löslich in Methanol, Ethanol, Aceton, Chloroform, Ether und Essigester, sehr schwer löslich dagegen in Wasser.

Das Kulturfiltrat ist im sauren und neutralen pH Bereich stabil, bei einem pH-Wert von 8 nimmt die Aktivität nach 2 Stunden ab, bei noch höheren pH-Werten noch schneller. Die Temperaturstabilität beträgt bei 50 ^{o}C 2,5 h; bei 37 ^{o}C 48 h; bei Raumtemperatur mindestens 96 h und bei 4 ^{o}C über 14 Tage. Beim Einfrieren konnte bislang kein Aktivitätsverlust festgestellt werden.

Der methanolische Mycelextrakt ist bei Raumtemperatur mindestens 7 Stunden stabil, bei 4 ^{o}C 48 h. Mycelextrakte mit Aceton und Ehanol zeigen bei beiden Temperaturen über 24 h keine Abnahme der Aktivität. Als Reinsubstanz ist Antimycin X in Methanol bei 4^{o}C mehrere Tage stabil.

4 ERGEBNISSE DER EXPERIMENTE MIT TÜ 2480

4.1 Charakterisierung des Produzenten

Die Beschreibung von Tü 2480 wurde ebenfalls unter der Leitung von Prof. Dr. W. Löffler durchgeführt. Auch hier erfolgte die Bestimmung nach Hütter, Bergey und Nonomura (3.1).

Morphologische Kennzeichen:

Sporenfarbe: cinereus (grau)

Sporenoberfläche: glatt

Sporenketten: Hier kann, da der Stamm nur sehr schlecht sporuliert, nicht zwischen weiten (Sb) und engen (Sa) Schraubenwindungen unterschieden werden (Streptomyces parvullus oder Streptomyces violaceoniger).

Aufgrund des C-Quellen-Spektrums im Vergleich mit Referenzstämmen (Tab. 4-1) handelt es sich bei Tü 2480 jedoch wahrscheinlich um Streptomyces violaceoniger ssp. erumpens.

Melaninreaktion: negativ

Auftreten dunkler Autolyse-Flecken

	Tü 2480	Streptom. parvullus ssp. plicatus Tü 80	Streptom. parvullus ssp. parvullus
L-Arabinose	+	+	+
D-Xylose	-	+	+
Inosit	+	+	+
D-Mannit	+	+	+
D-Fructose	+	+	+
L-Rhamnose	-	+	+
Saccharose	+	-	+
Raffinose	+	-	+/-
D-Glucose	+	+	+
Cellulose	-	-	+

Tab. 4-1: Verwertung von Kohlenstoffquellen durch Tü 2480 im Vergleich zu Referenzstämmen

4.2 Optimierung der Anzucht- und Produktionsbedingungen von Tü 2480

Auch hier wurde versucht, durch Variation der Fermentationsbedingungen die Ausbeute an den Pyridindolol-Glykosiden zu steigern.

4.2.1 Nährlösungsoptimierung

Die hier beschriebenen Verbindungen fielen im Screening unter Verwendung von Nährlösung 19 auf. Es sollte nun versucht werden, durch Variation des Nährmediums einerseits die Produktion zu steigern, andererseits aber auch eventuell modifizierte Stoffwechselprodukte zu finden.

Hierzu wurden verschiedene Nährlösungen getestet, und es wurde bei Nährlösung 19 Mannit durch Lactose, Saccharose, Stärke und Glycerin ersetzt. Beides brachte aber nicht die erwünschten Effekte: die Produktion von Pyridindolol und seiner Glykoside war bei allen Variationen geringer im Vergleich zu NL 19, und es konnten im Dünnschichtchromatogramm keine neuen Verbindungen gefunden werden.
Der Ersatz von 2 % Mannit durch 1 % oder 3 % brachte keinen deutlichen quantitativen Unterschied in der Ausbeute, allerdings ging die Produktion bei Verwendung von 1 % Mannit schneller wieder zurück, so daß NL 19 als das optimalste Medium beibehalten wurde.

4.2.2 Belüftung

In Kolbenversuchen wurde ermittelt, daß bei hohen Belüftungsraten die Produktion am frühesten einsetzt und auch die höchsten Werte erreicht. Wegen des starken Schäumens (zum Teil ging über die Hälfte der Kultur verloren) war bei den Fermentationen aber höchstens eine Belüftungsrate von 0,4 vvm möglich.

4.2.3 Temperatur

In Tab. 4-2 sind Wachstum und Produktion von Tü 2480 bei verschiedenen Temperaturen aufgeführt.

Temperatur in °C		Dauer 24 h	48 h	72 h	96 h	7 d
27		12 %	14 %	18 %	31 %	30 %
	a)	-	+	+++	+++	+++
	b)	-	Spur	+(+)	+++	+++
30		12 %	32 %	32 %	30 %	14 %
	a)	-	+++	+++	+++	+++
	b)	-	Spur	++	+++	+
33		12 %	34 %	28 %	27 %	20 %
	a)	Spur	+++	+++	+++	+++
	b)	-	Spur	+++	+++	+
37		15 %	34 %	30 %	27 %	24 %
	a)	+	+++	+++	+++	+++
	b)	Spur	Spur	+++	++	+

Tab. 4-2: Temperaturabhängigkeit von Wachstum und Produktion bei Tü 2480
Wachstum: Sedimentsbestimmung (%)
Produktion: halbquantitativ, Spur bis +++
a) Pyridindolol
b) Glykoside

Der Stamm wächst bei Temperaturen zwischen 33 °C und 37 °C am schnellsten an, die Produktion tritt dementsprechend auch früher auf, nimmt aber auch schneller wieder ab.

Bei Fermentationen wurde die Kolbenvorkultur deshalb 20 - 24 h lang bei 35 - 37 °C inkubiert, die Temperatur des 10 l und des 100 l Fermenters betrug zur Stabilisierung der Produktion aber nur noch 27 °C.

4.3 Fermentation von Tü 2480

Tü 2480 wurde zur Optimierung im 10 l Maßstab angezogen, Produktionsfermenter war der 100 l Fermenter. Die Fermentationsbedingungen und die Überwachung der Fermentation sind unter 2.6 darge-

stellt. Die Anzucht in 20 l und in 25 l Umwurffermentern brachte nur sehr ungenügende Mengen der erwünschten Sekundärmetabolite. Abb. 4-1 zeigt den Verlauf der Produktion bei Anzucht im Kolbenmaßstab, in Abb. 4-2 ist eine 100 l Fermentation dargestellt. Nährmedium der Kolben, der Vorkultur und der Fermenter war jeweils Nährlösung 19. Die Auswertung der Produktion erfolgte halbquantitativ über Vergleich der DC-Fleckgrößen und -intensitäten.

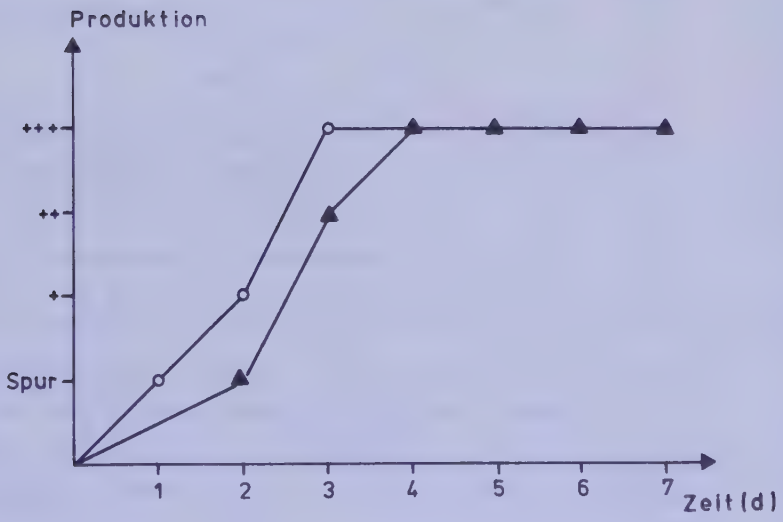


Abb. 4-1: Produktion von Tü 2480 in 500 ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane
Temperatur: 27 °C
angegeben sind relative Werte (Spur bis +++)
○—○ Pyridindolol
▲—▲ Gemisch der Pyridindolol-Glykoside

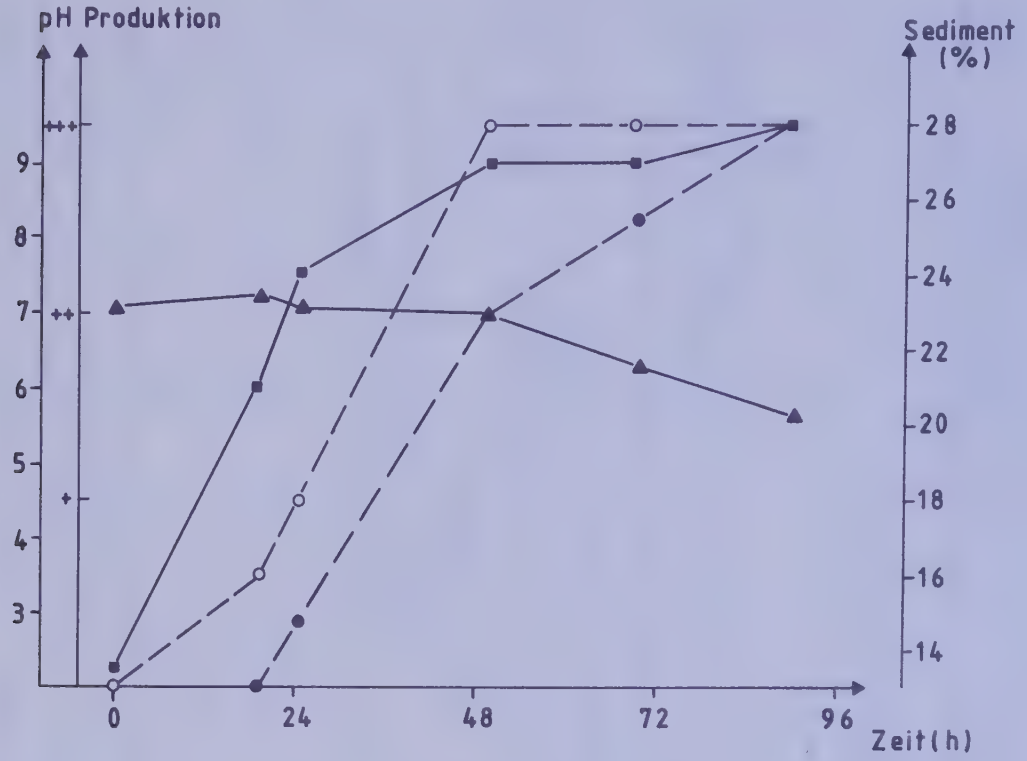


Abb. 4-2: Verlauf einer 100 l Fermentation von Tü 2480
○— —○ Menge Pyridindolol (relativ: +), ■——■ Sediment (%),
●— —● Menge Pyridindolol-Glykoside (relativ: +), ▲——▲ pH

4.4 Isolierung und Aufreinigung der Pyridindolol-Glykoside

Die Fermentationskulturen wurden wie unter 2.7.2 beschrieben aufgearbeitet.

Die Produkte binden quantitativ an Amberlite XAD-4. Bei 70 l Kulturfiltrat (30 % Sediment) wurden zur vollständigen Elution 20 l Methanol benötigt, aus dem Mycel konnten die Pyridindolol-Glykoside mit insgesamt 60 l Methanol (5 x 13 l) quantitativ extrahiert werden.

Nach der Chromatographie an Kieselgel 60 befanden sich Pyridindolol und seine Glykoside zusammen in der reinen Methanolfraktion.

4.5 Physikalisch-chemische Charakterisierung der Pyridindolol-Glykoside

4.5.1 Dünnschichtchromatographie

Der Nachweis der Produktion von Tü 2480 erfolgte nur durch Dünnschichtchromatographie an Kieselgel 60 DC-Alufolien. Im Fließmittelsystem Essigester / Methanol / Wasser 75 : 10 : 7,5 hatten die gebildeten Sekundärmetabolite folgende Rf-Werte:

Pyridindolol: Rf = 0,27

Pyridindolol-Glykoside: 2 unterscheidbare Flecken

Rf_1 = 0,14

Rf_2 = 0,1

Die Detektion aller 3 Flecken erfolgte durch auffallend helle Fluoreszenz im UV bei 366 nm.

Die unterschiedliche Hydrophilie der Substanzen kam auch dadurch zum Ausdruck, daß Pyridindolol, wie schon in der Literatur beschrieben, mit Essigester extrahierbar war (Aoyagi et al., 1975), die Glykoside dagegen in der wässrigen Phase blieben.

4.5.2 Stabilität

Im wässrigen System sind die Glykoside in einem pH-Bereich von 5 bis 9 stabil, bei thermischer Belastung bis 60 °C und 24 h konnte keine Zersetzung festgestellt werden.

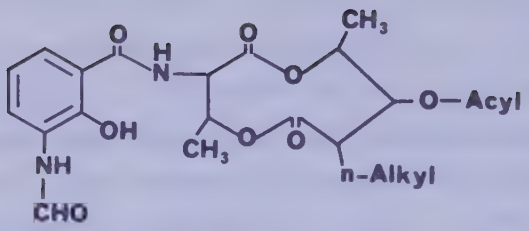
4.6 Biologische Charakterisierung von Tü 2480

Da beim Abschluß dieser Arbeit von den Pyridindolol-Glykosiden noch keine Reinsubstanz zugänglich war, kann für diese Verbindungen keine Aussage über ihre biologische Wirkung gemacht werden. Mit kristallinem Pyridindolol konnte, wie schon bei Aoyagi (1975) beschrieben, im Wirkungsspektrum keinerlei antimikrobielle Wirkung festgestellt werden.

Im Test auf Antiprotozoen- beziehungsweise toxische Wirkung auf höhere Organismen wurde bei einer Konzentration von 5 µg/ml nach 10 Tagen weder eine toxische Wirkung auf den Borstenwurm Dinophilus gyrociliatus festgestellt, noch eine Hemmung auf seinen Parasiten Eucoccidium dinophili. 10 µg/ml Pyridindolol waren nach 10 Tagen, 50 µg/ml nach 8 Tagen toxisch für den Wirt.

5 DISKUSSION TÜ 2386

Die biologische Wirkung im Primärtest und erste chemische Daten zeigten schon bald, daß das Stoffwechselprodukt von Tü 2386 in die Verwandtschaft der Antimycine gehört. Diese wurden 1948 erstmals von Leben und Keitt aus einem Streptomycetenstamm isoliert. Als Produzenten von Antimycinen sind vor allem bekannt:
Streptomyces kitazawaensis, Streptomyces griseus, Streptomyces blastmyceticus, Streptomyces flavochromogenes und Streptomyces olivochromogenes (Handbook of Antibiotic Compounds, 1980). Der hier bearbeitete Stamm, Streptomyces azureus, ist bisher als Antimycinproduzent noch nicht beschrieben. Bekannte Sekundärmetabolite von Streptomyces azureus sind Thiostrepton und Polypeptidantibiotika (Bergey, 1974).
Die Antimycine sind Macrodiolide (Keller-Schierlein, 1984), 9-gliedrige Dilactonringe, die über eine Amidgruppe mit 3-N-Formylamidosalicylsäure verbunden sind (Abb. 5-1). Antimycin A liegt als cokristallines Gemisch verschiedener Komponenten vor, Synonyme sind Antipiricullin A, Levoristatin F, Phyllomycin, Virosin und Vulgarin. Bekannt sind bis heute 10 Hauptkomponenten ($A_{0\ a-d}$ - A_6; s. Abb. 5-1) und 14 Nebenkomponenten, die sich nur in Länge und Verzweigungsgrad ihrer Alkyl- oder Acylsubstituenten unterscheiden (Schilling et al., 1970; Haegele und Desiderio, 1973). 1976 wurde von Ishiyama et al. ein weiterer Vertreter, das Deisovalerylblastmycin (Blastmycin = Antimycin A_3) ebenfalls aus einem Streptomycetenstamm isoliert.



Komponente		n-Alkyl-Rest	Acyl-Rest
A_0	a)	n-hexyl	hexanoyl
	b)	n-butyl	heptanoyl
	c)	octyl	butyryl
	d)	heptyl	isovaleryl
A_1		n-hexyl	isovaleryl
A_2		n-hexyl	butyryl
A_3		n-butyl	isovaleryl
A_4		n-butyl	butyryl
A_5		ethyl	isovaleryl
A_6		ethyl	butyryl

Abb. 5-1: Struktur der Antimycin A-Komponenten nach Schilling et al. (1970)

5.1 Produktionsoptimierung

Erstes Ziel dieser Arbeit war es, das im biologischen Screening gefundene Stoffwechselprodukt, Antimycin X, anzureichern und somit genügend Substanz für die chemische und biologische Charakterisierung zu gewinnen. Da der Stamm selbst nur sehr wenig Material produzierte, lag das Hauptgewicht primär auf einer Optimierung der Ausbeute. Erster Ansatzpunkt hierbei war es, die Anzuchtbedingungen des Stammes und die Nährlösung zu verbessern. Tü 2386 wächst nur sehr langsam, was zu langen Totzeiten bei den Fermentationen führt und vor allem auch eine mögliche Infektionsquelle darstellt. Es wurde daher versucht, den Stamm zuerst auf optimalen Wachstumsbedingungen anwachsen zu lassen und anschließend auf optimale Produktionsbedingungen umzuwechseln. Die aufgezeichneten Fermentationsverläufe zeigen, daß das Maximum der Produktion schon erreicht wird, während der Stamm noch wächst. Die weit verbreitete Trennung in Trophophase und Idiophase findet hier also nicht statt. Gleichzeitig ist dies schon ein Beweis dafür, daß der Stamm gegen das von ihm gebildete Antibiotikum unempfindlich sein muß. Limitierender Faktor der Fermentationen könnte die Belüftung sein: Der Sauerstoffpartialdruck sinkt während der Fermentation auf 0 ab, eine höhere Belüftungsrate würde eventuell die Ausbeute noch etwas steigern. Technisch war dies jedoch nicht möglich, bei höherer Luftzufuhr ging ein Teil der Kultur durch Überschäumen verloren. Eine Korrelation der Bildung von Antimycin X mit dem pH-Wert konnte nicht festgestellt werden, ebenso keine Limitierung durch die C-Quelle: Mannit und Glucose werden jeweils nur sehr langsam verwertet, die Produktion ist

schon abgeschlossen, während noch fast die Hälfte der Kohlenstoffquellen nicht verbraucht ist (bei 100 l Fermentationen mit 2 % Glucose sind zum Zeitpunkt maximaler Aktivität noch fast 1 % Glucose in der Kulturbrühe nachweisbar). Die Produktion von Antimycin X unterliegt also nicht der C-Repression.

Ein wichtiger Parameter für die Anzucht von Tü 2386 ist die Wahl des Rührsystemes im Fermenter: Fermentationen konnten gut nur mit Blattrührern durchgeführt werden; unter diesen Bedingungen wächst der Stamm in dichten Pellets. Bei Fermentern mit Umwurfsystem dagegen wächst er in Hyphen, wird dadurch empfindlicher gegen Umwelteinflüsse, wie zum Beispiel den Rührer, und der Bereich optimaler Wachstums- und Produktionsbedingungen wird sehr eng.

Ein begrenzender Faktor ist sicher auch die Aufarbeitung der Fermentationen: Antimycin X wird intrazellulär gebildet und ist relativ lipophil; im Mycel befindet sich deshalb bei der Ernte mindestens das 2 - 3 fache an Substanz im Vergleich zu dem, was ins Kulturfiltrat abgegeben wird. Mit Aceton oder Ethanol läßt sich die Substanz nur sehr schwer aus den Zellen herausholen, nach 5-maliger Extraktion befindet sich noch ein Großteil der Substanz im Mycel. Der Zusatz von Methanol bewirkt das "Aufknacken" der Zellen, gleichzeitig ist die Substanz im unreinen Zustand in Methanol aber sehr instabil, so daß bei Verwendung großer Mengen Methanol ein erheblicher Verlust beim Eindampfen in Kauf genommen werden müßte. Die anschließende Extraktion mit Essigester verläuft nur quantitativ, wenn in kleinen Portionen mindestens 3-5 mal mit äquivalenten Mengen Essigester ausgeschüttelt wird. Eine Extraktion mit Chloroform bringt kaum Verbesse-

rungen und ist in diesen Maßstäben auch nicht durchführbar. Ebenfalls keine besseren Ergebnisse brachte die in der Literatur für Antimycin A beschriebene Aufarbeitung über ein Ansäuern der Kulturbrühe, wodurch die Aktivität praktisch ganz ins Mycel verschoben wird (Seghal et al., 1976) und aus diesem mit Methanol / CH_2Cl_2 wieder extrahiert wird. Für eine Trennung über Adsorptionschromatographie hat das Molekül von seiner Struktur her zu wenige affine, bindungsfähige Gruppen, eine Extraktion ist folglich noch die geeignetste Aufarbeitung.

Eine weitere Möglichkeit, die Ausbeute an Sekundärmetaboliten zu erhöhen, setzt am Produzentenstamm an: Die Bildung von Protoplasten und deren Regeneration stellt heute ein sehr starkes mutagenes Mittel der Streptomycetengenetik dar (Hopwood, 1981; Ikeda et al., 1983).

Zur Gewinnung von Protoplasten muß der Stamm in einem osmotisch stabilen Medium flockig anwachsen, damit dem Lysozym zur Zerstörung der Zellwand eine möglichst große Angriffsfläche geboten wird. Um dieses lockere Wachstum zu ermöglichen, werden zur Anzucht des Stammes hohe Saccharosekonzentrationen (34 %) oder Glycin (0,1 - 1,5 %) zugefügt. Glycin wird außerdem anstelle von D-Alanin-Resten in die Zellwand eingebaut und trägt so auch mit zur Auflösung bei (Hopwood, 1981). Die Bedingungen für die Herstellung und die Regeneration der Protoplasten variieren dabei von Stamm zu Stamm sehr stark (Ogawa et al., 1983; Hopwood, 1981) und müssen jeweils in Vorversuchen erprobt werden.

Ebenso wie durch öftere Klonierung des Stammes konnten auch durch diese Methode genetischer Rekombination Einzelkolonien mit stark unterschiedlichem Wachstums- und Produktionsverhalten isoliert

werden.

Das Wissen, daß das Stoffwechselprodukt von Tü 2386 in die Verwandtschaft der Antimycine gehört, eröffnete eine weitere Möglichkeit, die Produktion zu beeinflussen: die Verfütterung möglicher Vorstufen aus der Biosynthese. Birch et al. (1962) teilten das Antimycinmolekül von der biogenetischen Seite aus in 6 Abschnitte ein (Abb. 5-2).

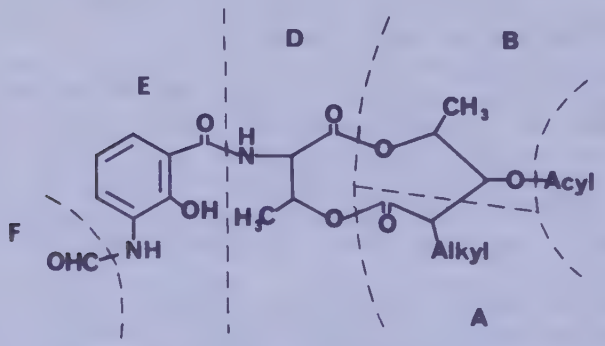


Abb. 5-2: Einteilung der Antimycin A-Strukturelemente nach ihrer biogenetischen Herkunft (Birch et al., 1962)

Mit Hilfe des Einbau's radioaktiv markierter Precursors leiteten sie Teil A vom Acetat-Malonat-Biosyntheseweg ab, Teil B direkt vom Pyruvat und den Acyl-Rest (C) von den Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin. Teil D ist die Aminosäure Threonin. Řeháček et al. fanden 1968 die 3-N-Formylaminosalicylsäure als Zwischenprodukt der Biosynthese des aromatischen Teiles (E). Diese wiederum entsteht aus Tryptophan über Formylkynurenin und Formylanthranilsäure. Neft und Farley konnten schließlich 1972 über radioaktiven Einbau die Herkunft des Aromaten aus dem Shikimisäure-

weg beweisen und nahmen Tryptophan oder Phenylalanin als mögliche Vorstufen an. Der Formamidocarbonylteil (F) des Moleküles stammt aus dem C-2 des Indolringsystemes.

Aufgrund dieser Kenntnisse erschien es nun möglich, die Produktion von Antimycin X durch Verfütterung von Tryptophan oder Phenylalanin zu steigern. Dazu wurden dem Stamm beide Aminosäuren in Konzentrationen bis zu 3000 mg/l vor und während der Anzucht angeboten. Eine wesentliche Steigerung der Antimycin X-Produktion konnte aber nicht beobachtet werden: Phenylalanin wurde von dem Stamm besser verwertet und brachte gleich gute bis geringfügig höhere Produktion im Vergleich zur Kontrolle; Tryptophankonzentrationen bis 300 mg / l zeigten gleiche Produktionswerte wie die Kontrolle, bei höheren Konzentrationen wurde das Tryptophan von dem Streptomyceten zu Anthranilamid abgebaut. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Neft und Farley (1972), die bei Zugabe von Tryptophan und Phenylalanin ebenfalls keine Steigerung der Antimycinproduktion erzielen konnten. Neft und Farley (1972) erklärten dies mit einem ziemlich großen Tryptophanpool in den Zellen, Tryptophan bzw. Phenylalanin sind also offensichtlich keine limitierenden Faktoren der Antimycin-Produktion. Ob Tryptophan oder Phenylalanin direkte Vorstufen sind, konnte bisher nicht geklärt werden.

5.2 Vergleich der chemischen und physikalischen Daten von Antimycin X mit Antimycin A

Die Verwandtschaft des Stoffwechselproduktes aus Tü 2386 mit Antimycin A fiel zuerst durch ähnliches Verhalten in der Dünnschichtchromatographie auf: Beide Substanzen zeigen helle Fluoreszenz bei 366 nm und lassen sich bei der Detektion mit Ehrlich's Reagens gleich anfärben. Die Rf-Werte weisen zwar auf ähnliches Verhalten hin, die Unterschiede zeigen aber, daß es sich nicht um die gleiche Substanz handeln kann. Die Zugehörigkeit von Tü 2386 in die Verwandtschaft der Antimycine ist auch aus dem UV-Spektrum ersichtlich: Maxima für Antimycin X bei 227 nm und bei 326 nm und für die Antimycine bei 225-228 nm und 325-330 nm (Handbook of Antibiotic Compounds, 1980). Deutliche Unterschiede zwischen Antimycin X und dem cokristallinen Gemisch Antimycin A zeigen sich im Schmelzpunkt:

Antimycin X 97 - 101 °C

Antimycin A 136 - 138 °C

und im ^{1}H-NMR Spektrum: Hier sind die Signale bei Antimycin A im Bereich zwischen 5 ppm und 6 ppm breit gestreut, bei Antimycin X dagegen sind sie etwas verschoben und im Bereich von 5 ppm dicht gedrängt (Abb. 5-3 und 5-4).

Den Beweis, daß es sich bei Antimycin A und Antimycin X nicht um die gleiche Substanz handelt, erbringt auch das Verhalten in der RP-HPLC (Abb. 5-5): Ein Gemisch aus Tü 2386 und gekauftem Antimycin A zeigt in der HPLC nicht mehr die Auftrennung, die bei den Einzelsubstanzen sichtbar war. Beide Stoffe können also nicht

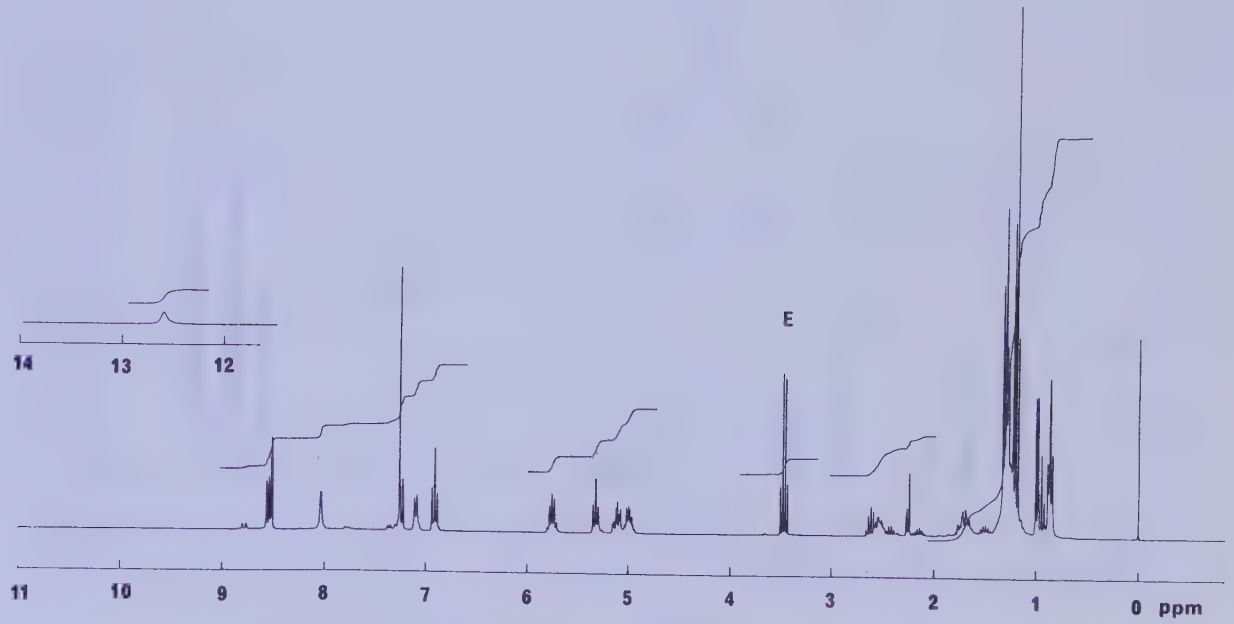


Abb. 5-3: ^{1}H-NMR Spektrum (300 MHz) von Antimycin A (Geiger, 1984).
Das mit "E" bezeichnete Signal stammt vom Lösungsmittel Ether

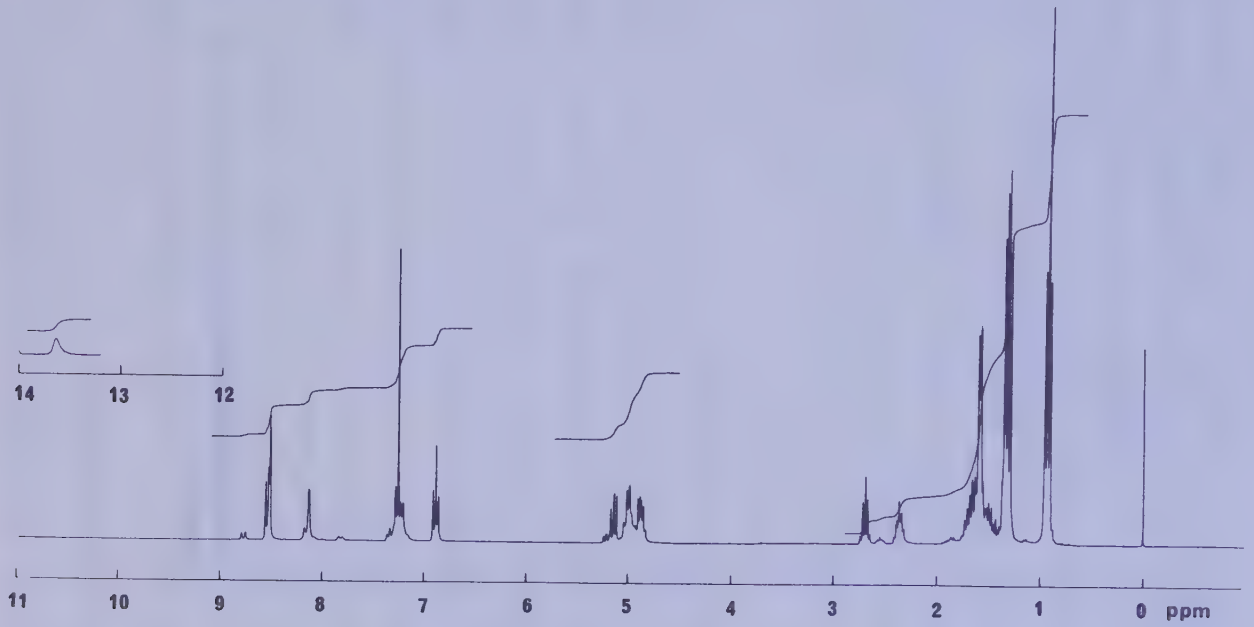


Abb. 5-4: ^{1}H-NMR Spektrum (300 MHz) von Antimycin X (Geiger, 1984)

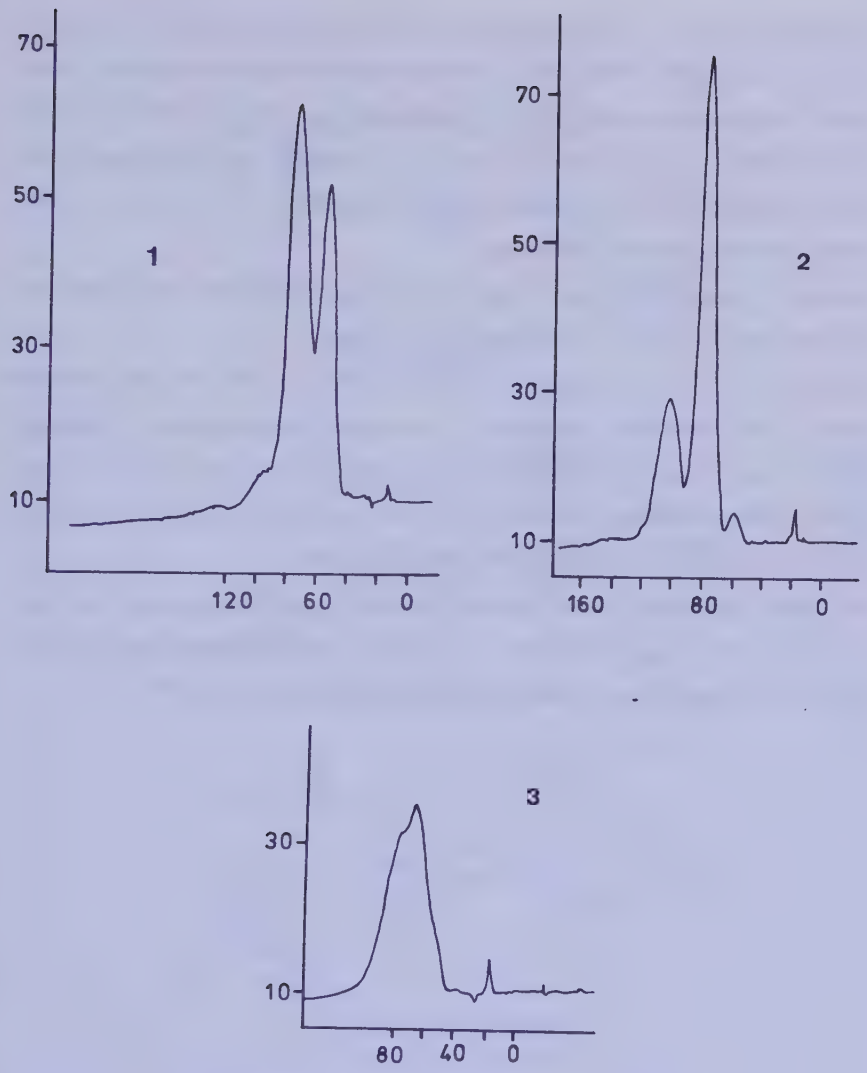


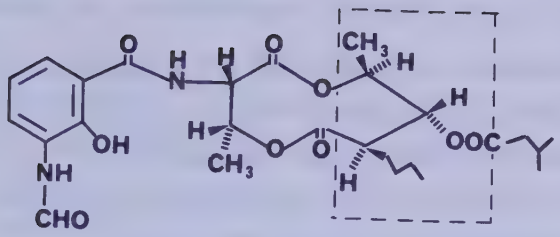
Abb. 5-5: Reversed-Phase HPLC von Antimycin A (1), Antimycin X (2) und dem Gemisch beider Substanzen (3) (Geiger, 1984)

identisch sein. Wie Antimycin A liegt auch Antimycin X als Gemisch, wahrscheinlich aus 3 Hauptkomponenten und eventuell mehreren Nebenkomponenten vor. Die aufgezeigten Unterschiede sind zu tiefgreifend, als daß sie nur auf veränderter Komponentenzusammensetzung oder auf dem Vorliegen anderer Alkyl- oder Acyl-Substituenten beruhen könnten.

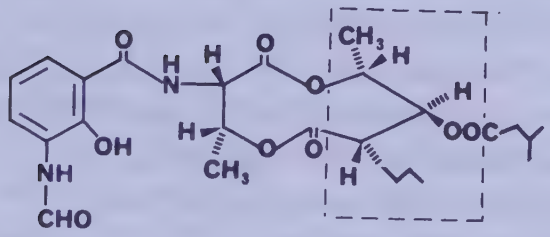
Aufgrund aller bisher bekannten Daten kann folgender Strukturvorschlag (nach Geiger, 1984) gemacht werden:

Bei Tü 2386 - Antimycin X könnte es sich um ein Diastereomeres einer oder mehrerer Antimycin - ähnlicher Verbindungen handeln. Solche natürlichen Diastereomere von Antimycinen sind bisher nicht beschrieben; Kinoshita et al. synthetisierten 1973 das Diastereomere von Antimycin A_3 (Abb. 5-6).

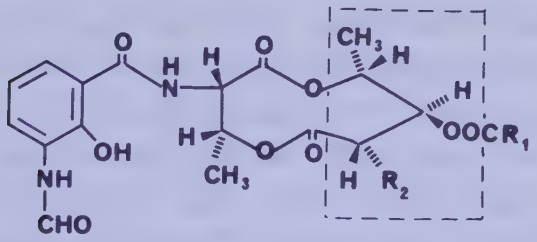
Ob außer der Konfiguration noch ein weiterer Unterschied zu den bekannten Antimycinen besteht und welche Seitenketten bei Antimycin X vorliegen, ist bisher noch nicht bekannt.



Antimycin A_3



Synthetisches Diastereomeres zu Antimycin A_3



R_1, R_2: unbekannt

Strukturvorschlag Tü 2386 - Antimycin X
(Geiger, 1984)

Abb. 5-6: Struktur von Antimycin A_3, des Diastereomeren von Antimycin A_3 (Kinoshita et al., 1973)und Strukturvorschlag für Antimycin X

5.3 Biologische Wirkung von Antimycin A und Antimycin X

Die Antimycine sind Hemmstoffe der Atmungskette von Eukaryoten und als solche wirksam gegen Pilze, Insekten, höhere Tiere und auch toxisch für den Menschen (Rieske, 1967).

Daß auch Antimycin X in die Atmungskette eingreift, ergibt sich aus dem Differenztest mit Pichia farinosa.

Antimycin A bindet stöchiometrisch mit sehr hoher Affinität an den Komplex III der Atmungskette (Berden und Slater, 1972). Dort hemmt es den Elektronentransport zwischen Cytochrom b und Cytochrom c_1. Der Mechanismus der Antimycinwirkung und die genaue Lokalisierung der Bindungsstelle im Komplex III sind noch nicht vollständig aufgeklärt (Chevillotte-Brivet et al., 1983; Esposti und Lenaz, 1982; Bowyer und Trumpower, 1981).

Die meisten Bakterien sind unempfindlich gegenüber Antimycin. Řehaček et al. (1968) untersuchten Streptomyces antibioticus, einen Antimycin-Produzenten, und fanden, daß dieser zwar durch die Atmungskettenhemmstoffe Cyanid und HQNO gehemmt wird, nicht aber durch Antimycin. Sie konnten ebenso wie Ramachandran und Gottlieb (1961) nachweisen, daß diese Resistenz des Streptomyceten und allgemein der Bakterien nicht auf mangelnder Permeabilität für das Antibiotikum beruht, sondern auf einem Fehlen der Antimycin-sensitiven Bindungstelle. Cyanid blockiert den Elektronentransport vom Cytochrom aa_3 auf den Sauerstoff (Lehninger, 1975), greift also an einer anderen Stelle der Atmungskette ein. Für das 2 n-Nonyl-4-hydroxyquinoline-N-oxid, das gleich wirkt wie das 2 n-Heptyl-4-quinoline-N-oxid (HQNO) (Kaniuga et al., 1969),

zeigten Riccio et al. (1981), daß es eine Bindungsstelle mit dem Antimycin gemeinsam hat, zugleich aber eine große Anzahl unspezifischer Bindungen eingeht. Auf diese ist die antibakterielle Wirkung wohl zurückzuführen. Für Antimycin X wurde im Wirkungsspektrum ebenfalls keine antibakterielle Aktivität gefunden, auch der Produzent Tü 2386 ist unempfindlich gegenüber seinem Antibiotikum. Daraus kann geschlossen werden, daß das Antimycin X wahrscheinlich an die gleiche oder eine ganz ähnliche Stelle im Komplex III bindet wie Antimycin A, zumindest aber an eine Stelle, die nur in der Atmungskette der Eukaryoten vorhanden ist. Für die Theorie von Řeháček (1968) spricht, daß im Plattendiffusionstest auf einen membrangeschädigten Streptomyceten (Tü 57; unter Zugabe von EDTA) durch keines der beiden Antimycine Hemmung erzielt werden konnte. Korzybski et al. (1978) beschreiben eine Wirkung von Antimycin A auf Bacillus cereus, Marquis (1965) auf Bacillus megaterium. Diese wird aber nicht durch eine Hemmung der Atmungskette, sondern über eine Beeinflussung membranständiger Transportprozesse erklärt. Auf beide Bakterien zeigten im Plattendiffusionstest weder Antimycin A noch Antimycin X eine Wirkung, im empfindlicheren Verdünnungsreihentest war das Wachstum bei Konzentrationen von 150 µg/ml zwar etwas verzögert, wurde aber nicht vollständig gehemmt. Der Effekt beider Antibiotika auf Bacillus subtilis / Minimalmedium ist wahrscheinlich ebenfalls auf eine Schädigung der Membran zurückzuführen.

Auf Hefen und Pilze wirken Antimycin A und Antimycin X qualitativ gleich. Morphologische Veränderungen konnten bei beiden Antibiotika nicht beobachtet werden.

Auf die im Plattendiffusionstest getesteten Organismen war das

Antimycin X meist annähernd gleich oder etwas besser wirksam als Antimycin A. Möglicherweise ist dies mit dadurch bedingt, daß Antimycin X etwas hydrophiler ist und dadurch besser im Agar diffundieren kann. Gegen diese Theorie spricht die schlechtere Hemmung bei Saccharomyces, Pichia und Candida sowie die Tatsache, daß die MHK-Werte des Antimycin X für Saccharomycopsis lipolytica und Hansenula minuta jeweils etwas niedriger liegen als die für Antimycin A. Diese im Verdünnungsreihentest erhaltenen Werte aber sind diffusionsunabhängig. Denkbar ist auch, daß Antimycin X leichter in die Organismen eindringen kann, durch seine veränderte Struktur besser an die Antimycin-sensitive Bindungsstelle im Komplex III bindet oder eine eventuelle Konformationsänderung der zur Wirkung notwendigen Enzyme effektiver ausbilden kann.
Besonders auffällig sind die großen quantitativen Unterschiede zwischen Antimycin A und Antimycin X bei Mucor miehei, Hansenula anomala und Trichophyton mentagrophytes. Daß dies sicher nicht durch Diffusion begründbar ist, zeigen die eindeutigen Ergebnisse aus dem Verdünnungsreihentest; auch für eine Erklärung über unterschiedliche Aufnahme sind die Differenzen zu groß. Hier liegt die Vermutung nahe, daß die spezifischen Bindungsstellen dieser drei Organismen in ihrer Struktur so ausgebildet sind, daß sie für Antimycin X erheblich größere Affinität aufweisen oder aber, daß Antimycin X in der Lage ist, durch seine Bindung eine erheblich stärkere Veränderung in der Umgebung der Bindungsstelle hervorzurufen und damit eine größere Wirkung zu erzielen. Genaue Aussagen hierüber können aber erst gemacht werden, wenn die Struktur von Tü 2386 vollständig bekannt ist und wenn der Wir-

kungsmechanismus der Antimycine aufgeklärt ist.

Kluepfel et al. (1970) bewiesen, daß die einzelnen Komponenten des Antimycin A-Komplexes zwar unterschiedlich große Hemmhöfe im Plattendiffusionstest aufweisen, diese Differenzen aber nur durch unterschiedliche Diffusion im Agar zustandekommen. Die minimalen Hemmkonzentrationen waren bei allen gleich. Für das synthetische Diastereomere des Antimycin A_3 sind für Candida albicans und Piricularia oryzae höhere, für Trichophyton mentagrophytes dagegen nur halb so große MHK-Werte im Vergleich zu natürlichem Antimycin A_3 beschrieben (Kinoshita et al., 1973). Dies untermauert die Annahme, daß es sich auch bei Antimycin X um ein Produkt mit veränderter Stereochemie handeln könnte.

5.4 Bedeutung der Antimycine

Anwendung findet das Antimycin A als selektives Fischgift: Fische zeigen erheblich größere Sensitivität gegenüber Antimycin A als die übrigen höheren Tiere, Konzentrationen von weniger als 1 µg/l wirken schon tödlich. Da unterschiedliche Fischarten unterschiedlich empfindlich sind und Antimycin in Gewässern rasch wieder abgebaut wird, wird es vor allem in den USA und Kanada dazu benutzt, Fischteiche selektiv von bestimmten Arten, z.B. Raubfischen, zu säubern (Lennon und Vézina, 1973).

Handelsname: Fintrol ^{R}

Für eine Anwendung z.B. im Pflanzenschutz ist das bisher bekannte Antimycin A zu toxisch.

Als spezifischer Hemmstoff der Atmungskette gehört das Antimycin

aber auch in die in der Einleitung genannte Gruppe von Sekundärmetaboliten, die als biochemische Werkzeuge dienen: Es ist heute ein wichtiges Hilfsmittel zur Aufklärung der Elektronenübertragung in der Atmungskette (Franklin und Snow, 1973; Bowyer und Trumpower, 1981). Beconi et al. (1983) beschrieben die Verwendung von Antimycin zur Auffindung und Klärung alternativer Endoxidase-Systeme in Pflanzen: Einige Pflanzenmitochondrien besitzen demnach eine aktive Endoxidase, die die Cytochrom-Kette umgeht. Mit Hilfe von Antimycin kann ein System aufgebaut werden, in dem nur die Cytochrom - unabhängige Atmung funktioniert und das die Aufklärung der alternativen Endoxidase möglich macht. Des weiteren wird Antimycin verwendet für Studien zur Aufklärung des Photosyntheseapparates bakterieller Chromatophoren und von Chloroplasten (Venturoli und Melandri, 1982; Garab und Farineau, 1983; Yu und Yu, 1983).

Anwendung findet Antimycin A aber auch als biochemisches Werkzeug in der Humanmedizin: So konnten Spycher et al. (1983) mit Hilfe von Antimycin A rezeptor-vermittelte von nicht-rezeptor-vermittelten Vorgängen bei der Bindung von Immunglobulin G an menschliche Thrombozyten unterscheiden. Diese Bindung ist ein diagnostisches Kriterium für eine immunologische Schädigung der Thrombozyten und dient auch als Verlaufskriterium klinischer Fälle von z.b. multiplem Myelom und anderen Autoimmunerkrankungen.

Als Hemmstoff des pankreatischen Glucosemetabolismus und damit der Insulinsekretion dient Antimycin als Modellsubstanz bei der Aufklärung des Mechanismus der Insulinsekretion (Lenzen und Klöppel, 1984).

In seiner Eigenschaft als spezifischer Hemmstoff des Komplexes III wird Antimycin von Kelley und Corkey (1983) zur Untersuchung des cerebrohepatorenalen Syndromes (CHRS) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine letal verlaufende Krankheit mit cerebraler Fehlentwicklung, hepatischer Zirrhose und renalen Microzysten. In den Mitochondrien von CHRS-Fibroblasten liegt wahrscheinlich ein quantitativer Mangel oder ein funktioneller Fehler am Komplex III der Atmungskette vor, der Stelle, an die das Antimycin spezifisch bindet.

Ein letztes Beispiel für die Anwendung von Antimycin ist die Aufklärung der Folgen chronischen Alkoholkonsums (Thayer und Rubin, 1982). Hier wird die atmungshemmende Wirkung des Antimycins dazu gebraucht, die mitochondriale Funktion isolierter Rattenhepatozyten nach Alkoholbehandlung zu untersuchen, wobei vermutet wird, daß chronischer Alkoholkonsum den Gehalt an den b-Cytochromen um 50 % senkt und Veränderungen an der Membran bewirkt.

Diese Beispiele zeigen, daß den Antimycinen heute durchaus noch große Bedeutung zukommt. Insofern kann ein neues, modifiziertes Antimycin interessant sein

1) für die endgültige Aufklärung der spezifischen Antimycin-Bindungsstelle im Komplex III der Atmungskette und die Wirkungsweise der Antimycine,
2) zur Aufklärung des Mechanismus der Elektronenübertragung in der Atmungskette, speziell des Zusammenhanges zwischen Struktur und Funktion im Cytochrom b - c_1 Teil,
3) als Hilfsmittel in Biochemie, Molekularbiologie und Medizin.

6 DISKUSSION TÜ 2480

Tü 2480 fiel im chemischen Screening durch die Bildung von drei, im DC hell - eigenfluoreszierenden Flecken auf. Im Labor von Prof. Keller-Schierlein wurden diese als Pyridindolol und Pyridindolol-Glykoside identifiziert.
Das Pyridindolol wurde erstmals 1975 von Aoyagi et al. aus Streptomyces alboverticillatus isoliert. Glykoside dieser Substanz sind bisher nicht bekannt.

6.1 Experimenteller Teil

Für die Strukturaufklärung der gefundenen Sekundärmetabolite und den anschließenden breiten biologisch / pharmakologischen Test mußte zunächst genügend Substanz zur Verfügung gestellt werden.
Ein wesentliches Merkmal sekundärer Metabolite ist nach Zähner et al. (1982 a; 1983) ihre große Variationsbreite: So wurden zum Beispiel aus Aspergillus cristatus je nach Nährmedium bis zu 15 verschiedene Anthrachinone isoliert, beschrieben sind bis zu 50 Variationen eines Stoffwechselproduktes durch einen einzelnen Produzentenstamm.
Durch Verfütterung verschiedener C-Quellen und die Verwendung von z.B. Hafermehl, das bei anderen Stämmen schon durch die Produktion einer breiten Palette von Substanzen aufgefallen war, sollten nun zwei Effekte erreicht werden: erstens eine Steigerung der Ausbeute und zweitens die Gewinnung modifizierter Stoffwechselprodukte.

Zur Bildung des Pyridindolols konnte der Stamm alle angebotenen Zucker und auch Hafermehl verwerten, die Glykoside dagegen wurden in gut nachweisbaren Mengen nur mit Mannit und, allerdings mit geringerer Ausbeute, mit Glycerin und Stärke produziert. Im Dünnschichtchromatogramm konnten bei der Verwendung von Glycerin und Stärke keine Veränderungen erkannt werden; ob ein Austausch des Glykosid-Anteiles vorliegt, müßte eine getrennte Isolierung und Strukturanalyse klären.

Das Pyridindolol und seine Glykoside gehören als ß-Carbolin-Verbindungen (Kumagai et al., 1975) zu den Indol-Derivaten. Soerens et al. gelang 1979 die chemische Synthese des Pyridindolols aus Tryptophanmethylester und dem Acetonid des Glycerinaldehyds.

Zur Steigerung der Ausbeute wurden deshalb Tryptophan und Tryptamin als wahrscheinliche Vorstufen aus der Biosynthese verfüttert. Konzentrationen von 300 mg / l bis 3 g / l Tryptophan brachten eine etwas früher einsetzende Bildung von Pyridindolol und eine spätere Abnahme der Pyridindolol-Glykoside. Quantitative Verbesserungen konnten im Dünnschichtchromatogramm nicht erkannt werden, zusätzlich wurde aber noch Anthranilsäure als Abbauprodukt des Tryptophans gebildet. Der Zusatz von Tryptamin bewirkte in Konzentrationen bis 300 mg / l keine Veränderung gegenüber der Kontrolle, bei höheren Konzentrationen wurden die erwünschten Sekundärmetabolite nicht mehr gebildet. Tryptophan kann also als mögliche Vorstufe in der Biosynthese der Pyridindolol-Verbindungen vermutet werden, die Verwendung zur Ausbeutesteigerung ist wegen der zusätzlichen Belastung der Aufarbeitung durch Tryptophanabbauprodukte und des nur unwesentlich steigernden Effektes im Moment nicht angebracht. Genaue Aussagen lassen sich aber

erst machen, wenn die quantitative Auswertung genauer, z.B. über einen Scanner, erfolgt.

6.2 Beschreibung der Substanzen

Mit dem in dieser Arbeit gebrauchten Fließmittelsystem waren im DC drei Flecke sichtbar: das Pyridindolol (F_1) und zwei seiner Glykoside (F_2 und F_3). Durch Verwendung eines anderen Laufmittels und durch längere Laufstrecken konnte bei der chemischen Bearbeitung an der ETH Zürich noch ein weiteres Glykosid (F_4) isoliert werden.

Fließmittelsystem: Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %): 6/5/1

Rf-Werte:

Pyridindolol	F_1 : 0,73	
Glykoside	F_2 : 0,37	
	F_3 : 0,30	
	F_4 : 0,23	(Hagmann, 1984).

Aus einer 100 l Fermentation erhält man an chemisch reinen, kristallinen Substanzen:

ca. 2,5 g Pyridindolol	ca. 2,0 g F_2
ca. 1,0 g F_3	ca. 1,0 g F_4 (Hagmann, 1984)

Das Pyridindolol gehört in die große Gruppe von Enzyminhibitoren, die als Sekundärmetabolite von Mikroorganismen gefunden wurden. Weitere Beispiele sind (Demain, 1983; Woodruff, 1980):

- Monacolin K (Hemmstoff der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase) mit möglicher Anwendung als Hemmstoff der

Cholesterinsynthese

- Bestatin (Hemmstoff der Aminopeptidase B), Immunmodulator
- Hemmstoffe der Dopamin-ß-hydroxylase, Monoaminooxidase

Dopadecarboxylase, Histidindecarboxylase, cAMP-diesterase

Pyridindolol hemmt spezifisch und nicht-kompetitiv die neutrale ß-Galactosidase der Rinderleber unter sauren Bedingungen. Im neutralen bzw. auf ß-Galactosidasen anderer Organe, anderer Tierspezies oder des Menschen wurde keinerlei Wirkung gefunden (Kumagai et al., 1976). Die Ursache hierfür ist nicht bekannt. Nach Kumagai et al. (1976) sind für die Wirkung die Hydroxy-Gruppen und das ß-Carbolin-Grundgerüst notwendig (Abb 6-1). Die protonierte Form ist besser wirksam als die freie Base.

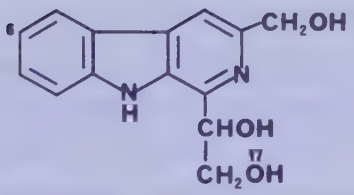


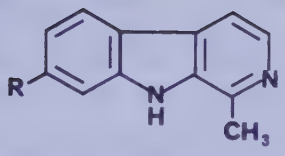
Abb. 6-1: Struktur des Pyridindolols (Kumagai et al., 1975)

Nach Hagmann (1984) ist bei F_2 wahrscheinlich der Sauerstoff in Position 17 glykosidiert. Um wieviele und welche Zucker es sich handelt, ist bisher ebenso unbekannt wie Position, Menge und Art

der Zucker bei F_3 und F_4. Ebenso kann noch nicht entschieden werden, ob die Glykosidierung Einfluß auf die Wirkung des Pyridindolols hat. Kumagai et al. (1976) nehmen an, daß die protonierte Form des Pyridindolols an eine negativ geladene Gruppe der ß-Galactosidase unter Bildung eines Pyridindolol-Enzym-Komplexes bindet. Wie oben erwähnt, wirkt das Pyridindolol nur im sauren, unter diesen Bedingungen werden Glykosidbindungen aber gespalten, und die freien Hydroxylgruppen lägen wieder vor. Bedeutung kann die Glykosidierung einer Substanz z.B. für ihr pharmakokinetisches Verhalten haben: Resorption, Verteilung und Elimination werden stark beeinflußt durch den Grad der Hydrophilie bzw. Lipophilie eines Stoffes. Ein positiver Effekt einer Glykosidierung ist für die Anthracycline beschrieben: Hier ist bekannt, daß die ganzen Moleküle wesentlich besser anti-Tumor wirksam sind als die Aglyka alleine.

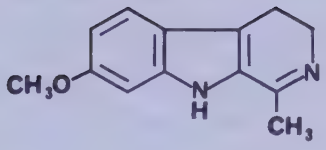
Eine Hemmung der ß- Galactosidase hat insofern Bedeutung, als Bosmann (1972) nachgewiesen hat, daß die ß-Galactosidase-Aktivität in Fibroblasten nach Transformation durch oncogene Viren signifikant erhöht ist. Die Erhöhung von Proteasen und Glykosidasen könnte seiner Meinung nach eine Veränderung der neoplastischen Oberfläche bewirken, dies hätte Bedeutung für die Zellpermeabilität, den Kontakt zwischen den Zellen, eine Induktion synthetischer Prozesse in der Zelle sowie die Entstehung von Metastasen und könnte somit für die Oncogenität mitverantwortlich sein.

Als ß-Carbolin-Verbindungen gehören das Pyridindolol und seine Glykoside in die Verwandtschaft der Harman-Alkaloide:

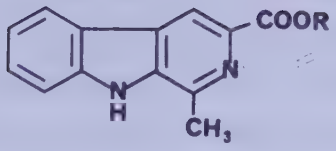


R = H : Harman

R = OCH_3 : Harmin



Harmalin



R = H : Harman-3-Carbonsäure

in der Natur R = Zuckerrest

Abb. 6-2: Struktur einiger Harman-Alkaloide

Das dem Pyridindolol ähnlichste Produkt ist die Harman-3-Carbonsäure (Abb. 6-2). Sie liegt in der Natur als Glykosid vor. Die Verbindung wurde 1962 von Antonaccio und Budzikiewicz isoliert und als erstes Alkaloid beschrieben, das sich biogenetisch vom Tryptophan und nicht vom Tryptamin ableitet. Dies steht im Ein-

klang mit den oben erwähnten Ergebnissen der Verfütterung von Tryptophan und Tryptamin für Pyridindolol und seine Glykoside. Harman-Verbindungen wurden erstmals 1841 aus Peganum harmala (Steppenraute) und Banisteriopsis caapi (Liane) isoliert, sind aber weit verbreitet in vielen Pflanzenfamilien, die keine offenkundige Beziehung zueinander haben und auch geographisch weit voneinander entfernt sind (Zogophyllaceae - Wüstengebiete der Mittelmeerländer; Malpighiaceae - Tropen Kolumbiens; Rutaceae; Rubiaceae; Passifloraceae; Polygonaceae; Leguminosae) (Manske, 1965). Gefunden wurden die Harman-Alkaloide als wirksame Stoffe eines in den westlichen Amazonasgebieten von Eingeborenen hergestellten halluzinogenen Getränkes, des "caapi" oder auch "yage" (Martindale, 1982). In die weitere Strukturverwandtschaft dieser Stoffe gehören auch die Psilocybe-Rauschgifte und die Lysergsäurederivate. Die zentralen Wirkungen dieser Substanzen beruhen auf teils agonistischer, teils antagonistischer Interaktion mit serotoninergen, noradrenergen und dopaminergen Schaltstellen (Stille, 1983). Von daher ist z.B. auch die Antiparkinsonwirkung des Harmins zu erklären (Hesse, 1971). Als Monoaminooxidasehemmstoffe (Schneider, 1975) wirken die Harman-Alkaloide zentral stimulierend und psychomotorisch aktivierend. Synthetische Monoaminooxidasehemmstoffe werden in der Medizin als Antidepressiva eingesetzt. Komissarov und Abramets (1982) beschreiben die Interaktion von Harman und ß-Carbolin-3-carboxylsäure mit Benzodiazepin-Rezeptoren, von denen sie markierte Benzodiazepine verdrängen können. Außerdem werden den Harman-Verbindungen antiprotozoen- und anthelmintische Wirkung zugeschrieben (Naranjo, 1979; Lewin, 1962). Nach Naranjo (1979) wurden Harman-ähnliche Verbindungen

inzwischen auch in Tieren gefunden, das Adrenoglomerulotropin, ein Hormon der Epiphyse, soll identisch sein mit 6-Methoxy-tetrahydroharman, das wiederum ein Isomer des Tetrahydroharmins ist, eines der Alkaloide aus Banisteriopsis. Eine weitere Substanz, das 6-Methoxyharmalan entsteht aus Melatonin, dem 6-Methoxy-N-acetylserotonin und wirkt als starker peripherer Serotonin-Antagonist (McIsaac et al., 1961).

Diese Verwandtschaft der Pyridindolol-Derivate mit den Harman-Alkaloiden macht noch einmal Ziel und Sinn der neuen Screeningmethoden deutlich: Die im chemischen Screening ohne irgendeine biologische Korrelation gefundenen Substanzen haben durchaus gute Chancen, sich in einer noch folgenden pharmakologischen Prüfung als sehr interessant zu erweisen, sei es auf dem Gebiet der Tumortherapie über die ß-Galactosidase-inhibierende Wirkung oder aber auf einem Gebiet, das den Wirkungen der Harman-Alkaloide nahesteht.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Zwei Streptomycetenstämme, Tü 2386 und Tü 2480, wurden mit Hilfe unterschiedlicher Screeningmethoden auf die Produktion neuer Sekundärmetabolite untersucht.

Aus Tü 2386 wurde im klassischen Screening nach antifungischer Aktivität eine Substanz isoliert, die in die Verwandtschaft der Antimycine gehört und Antimycin X genannt wurde. Da die chemische Bearbeitung noch nicht abgeschlossen ist, kann über die Struktur dieses neuen Antimycins noch keine endgültige Aussage gemacht werden, es könnte sich eventuell um ein Diastereomeres einer oder mehrerer Antimycin-ähnlicher Verbindungen handeln, und es liegt wahrscheinlich, wie Antimycin A auch, als ein Gemisch mehrerer Komponenten vor. Die chemischen und biologischen Daten beweisen eindeutig, daß Antimycin X mit Antimycin A nicht identisch ist.

Wie Antimycin A wirkt auch Antimycin X als Hemmstoff eukaryotischer Atmungsketten, es hat auf Hefen und Pilze eine ähnliche, meist etwas höhere Wirkung als Antimycin A. Sehr viel stärker wirksam ist es auf Mucor miehei, Hansenula anomala und Trichophyton mentagrophytes. In der Prüfung auf akute Toxizität hat sich Antimycin X als weniger toxisch im Vergleich zu Antimycin A erwiesen.

Die Produktion der Substanz erfolgte in Fermentern mit Blattrührsystem, die Aufarbeitung aus dem Kulturfiltrat durch Extraktion mit Essigester, aus dem Mycel durch Extraktion mit Methanol/Aceton und anschließendes Ausschütteln mit Essigester. Eine weitere Aufreinigung ist über Säulenchromatographie an Kieselgel 60 und Sephadex LH 20 möglich.

Im chemischen Screening wurden aus Tü 2480 vier Substanzen isoliert, die durch helle Eigenfluoreszenz in der Dünnschichtchromatographie aufgefallen waren. Es handelt sich hierbei um Pyridindolol, einen schon beschriebenen ß-Galactosidasehemmstoff, und drei zugehörige Glykoside. Pyridindolol-Glykoside sind bisher noch nicht bekannt.

Fermentiert wurde der Stamm mit Blattrührsystem in einer Nährlösung aus Sojamehl und Mannit. Das Kulturfiltrat wurde über Amberlite XAD-Adsorptionschromatographie aufgearbeitet, das Mycel entsprechend nach Extraktion mit Methanol. Die weitere Aufreinigung erfolgte über Kieselgelsäulenchromatographie.

Um welche und wieviele Zuckerreste es sich bei den einzelnen Glykosiden jeweils handelt, ist noch unklar, ebenso für zwei der Glykoside, an welchen Stellen sie glykosidiert sind. Da Reinsubstanz der neuen Verbindungen noch nicht zugänglich war, kann über ihre biologische Wirkung keine Aussage gemacht werden, eine breite biologisch/pharmakologische Prüfung wird noch durchgeführt werden.

8 L I T E R A T U R

Aoyagi, T., Kumagai, M., Hazato, T., Hamada, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H. (1975):
Pyridindolol, a new ß-galactosidase inhibitor produced by actinomycetes
J. Antib. 28, 555-557

Antonaccio, L.D. und Budzikiewicz, H. (1962):
Harman-3-Carbonsäure, ein neues Alkaloid aus Aspidosperma polyneuron
Monatshefte für Chemie 93, 962-964

Auterhoff, H. und Lohmann, V. (1957):
Die Perjodatreaktion in der pharmazeutischen Analyse
Deutsche Apotheker Zeitung 40, 904-905

Beconi, M.T., Sánchez, R.A. and Boveris, A. (1983):
Alternative oxidase and Cyanide- and Antimycin-insensitive respiration in corn root mitochondria
Plant Sci. Lett. 32, 125-132

Berden, J.A. and Slater, E.C. (1972):
The allosteric binding of Antimycin to cytochrome b in the mitochondrial membrane
Biochim. Biophys. Acta 256, 199-215

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974)
8. Aufl. Williams & Wilkins Co., Baltimore

Birch, A.J., Cameron, D.W., Harada, Y. and Rickards, R.W. (1962):
Studies in relation to biosynthesis. Part XXV.
A preliminary study of the Antimycin A complex
J. Chem. Soc. Lond., 303-305

Bosmann, H.B. (1972):
Elevated glycosidases and proteolytic enzymes in cells transformed by RNA tumor virus
Biochim. Biophys. Acta 264, 339-343

Bowyer, J.R. and Trumpower, B.L. (1981):
Rapid reduction of cytochrome c_1 in the presence of Antimycin and its implication for the mechanism of electron transfer in the cytochrome b-c_1 segment of the mitochondrial respiratory chain
J. Biol. Chem. 256, 2245-2251

Brockmann, H. und Schmidt-Kastner, G. (1955):
Valinomycin I.
Chem. Ber. 88, 57

Cassady, J.M. and Floss, H.G. (1977):
Ergolines as potential prolactin and mammary tumor inhibitors
Lloydia 40, 90-106

Chevillotte-Brivet, P., Meunier-Lemesle, D., Forget, N. and Pajot, P. (1983):
Is cytochrome b really the Antimycin-binding component of the cytochrome b-c_1 complex of yeast mitochondria
Eur. J. Biochem. 129, 653-661

Dähn, U., Hagenmeier, H., Höhne, H., König, W.A., Wolf, G. und Zähner, H. (1976):
Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der Chitinsynthese bei Pilzen
Arch. Microbiol. 107, 143-160

Dehler, W. (1979):
Nikkomycine- Studien zur Fermentation und Isolierung
Dissertation Tübingen

Demain, A.L. (1983):
New applications of microbial products
Science 219, 709-714

Dorgerloh, M. (1980):
Vehicle-Warhead-Konzept zur Aufnahme natürlicher und synthetischer Hemmstoffe
Dissertation Tübingen

Drautz, H. and Zähner, H. (1981):
A new method of screening for secondary metabolites in streptomyces
in: Schaal, Pulverer (eds.)
Actinomycetes, Zbl. Bakt. Suppl. 11, 515-519
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

Esposti, M.D. and Lenaz, G. (1982):
Effect of Antimycin on the rapid reduction of cytochrome c_1 in the bc_1 region of the mitochondrial respiratory chain
FEBS Letters 142, 49-53

Fauth, U. (1984):
Isolierung eines antifungischen Antibiotikums aus Streptomyces galbus
Diplomarbeit Tübingen

Franklin, T.J. und Snow, G.A. (1973)
in: Biochemie antimikrobieller Wirkstoffe, 134-136
Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin

Garab, G. and Farineau, J. (1983):
Is Antimycin A a specific inhibitor of the slow rise of the electrochromic absorbance change in intact chloroplasts ?
Biochem. Biophys. Res. Com. 111, 619-623

Geiger, A. (1984):
persönliche Mitteilung

Golding, B.T., Rickards, R.W., Meyer, W.E., Patrick, J.B. and Barber, M. (1966):
The structure of the macrolide antibiotic pimaricin
Tetrahedron Letters 30, 3551-3557

Haegele, K.D. and Desiderio, D.M. (1973):
Structural elucidation of minor components in the Antimycin A complex by mass spectrometry
J. Antib. 26, 215-222

Hagmann, L. (1984):
persönliche Mitteilung

Hamada, M., Hashimoto, T., Takahashi, T., Yokoyama, S., Miyake, M., Takeuchi, T., Okani, Y. and Umezawa, H. (1965):
Antimicrobial activity of kasugamycin
J. Antib. 18, 104-106

Handbook of Antibiotic Compounds (1980):
Vol II Macrocyclic Lactone (Lactam) Antibiotics, 377-387
Bérdy, J., Aszalos, A., Bostian, M., McNitt, K.L. (eds.)
CRC Press Inc. Boca Raton, Florida

Hesse, E. (1971):
Rausch-, Schlaf- und Genußgifte, 94-95
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

Hopwood, D.A. (1981):
Genetic studies with bacterial protoplasts
Ann. Rev. Microbiol. 35, 237-272

Hütter, R., Keller-Schierlein, W., Nüesch, J. and Zähner, H. (1965):
Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen.
48. Mitteilung: Scopamycine
Arch. Mikrobiol. 51, 1-8

Hütter, R. (1967):
Systematik der Streptomyceten
Karger Verlag, Basel

Ikeda, H., Inoue, M. and Omura, S. (1983):
Improvement of macrolide antibiotic-producing streptomycete strains by the regeneration of protoplasts
J. Antib. 36, 283-288

Ishiyama, T., Endo, T., Otake, N. and Yonehara, H. (1976):
Deisovalerylblastmycin produced by streptomyces sp.
J. Antib. 29, 804-807

Isono, K. and Suzuki, S. (1979):
The Polyoxins: pyrimidine nucleoside peptide antibiotics inhibiting fungal cell wall biosynthesis
Heterocycles 13, 333-351

Iwasa, T., Higshide, E., Yamaoto, H. and Shibato, M. (1971):
Studies on validamycins, new antibiotics. II.
J. Antib. 24, 107-114

Kaniuga, Z., Bryla, J. and Slater, E.C. (1969):
Inhibitors around the Antimycin-sensitive site in the respiratory chain
in: Bücher, Th. and Sies, H. (eds.)
Inhibitors-Tools in Cell Research, 282-300
Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin

Kavanagh, F. (1963):
Dilution methods of antibiotic assay
in: Analytical Microbiology, 124-140
Academ. Press

Keller-Schierlein, W. (1984)
Macropolyolide
in: Laskin, A.J., Lechevalier, H.A. (eds.)
CRC Handbook of Microbiology, 2 nd Ed., Vol. V, 165-168
CRC Press Inc. Boca Raton, Florida

Keller-Schierlein, W., Naegeli, H.U., Zähner, H. and Diddens, H. (1980):
Recent developments in the chemistry of Sideramines and Sideromycins
in: Beal, J.L. and Reinhard, E. (eds.)
Natural Products as Medicinal Agents, 29-43
Hippokrates Verlag, Stuttgart

Kelley, R.I. and Corkey, B.E. (1983):
Increased sensitivity of cerebrohepatorenal syndrome fibroblasts to Antimycin A
J. Inher. Metab. Dis. 6, 158-162

Kinoshita, M., Aburaki, S., Wada, M. and Umezawa, S. (1973):
Total synthesis of Antimycin A_3 and its diastereomer
Bull. Chem. Soc. Jap. 16, 1279-1287

Kirst, G. (1971):
Untersuchungen zur Hemmung der Zygosporenbildung bei Mucor hiemalis
Dissertation Tübingen

Kluepfel, D., Sehgal, N. and Vézina, C. (1970):
Antimycin A components. I. Isolation and biological activity
J. Antib. 23, 75-80

Kneer, M. (1980):
Disorbimycin, ein neues Engspektrum-Antibiotikum aus Penicillium chrysogenum
Dissertation Tübingen

Komissarov, I.V. and Abramets, I.I. (1982):
Characteristics of the Gaba-potentiating action of Harman
Bull. Exp. Biol. Med. 94, 1382-1384

Korner, A. (1969):
Inhibitors as tools in elucidating hormone action
in: Bücher, Th. and Sies, H. (eds.)
Inhibitors- Tools in Cell Research, 126-133
Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin

Korzybski, T., Kowszyk-Gindifer, Z. and Kurylowicz, W. (1978):
Antimycins
in: Antibiotics: Origin, Nature and Properties Vol. II
Am. Soc. Microbiol., Washington, 1078-1086

Kumagai, M., Aoyagi, T. and Umezawa, H. (1976):
Inhibitory activity of Pyridindolol on ß-Galactosidase
J. Antib. 29, 696-703

Kumagai, M., Naganawa, H., Aoyagi, T., Umezawa, H., Nakamura, H. and Iitaka, Y. (1975):
Structure of Pyridindolol, inhibitor of ß-Galactosidase
J. Antib. 28, 876-880

Lardy, H.A., Johnson, D. and McMurray, W.C. (1958):
Antibiotics as Tools for Metabolic Studies. I. A Survey of Toxic Antibiotics in respiratory, phosphorylative and glycolytic systems
Arch. Biochim. Biophys. 78, 587-597

Leben, C. and Keitt, G.W. (1948):
An antibiotic substance active against certain phytopathogens
Phytopathologie 38, 899-906

Lehninger, B. (1975):
Biochemistry, 2nd ed., 489 ff

Lennon, R.E. and Vézina, C. (1973):
Antimycin A, a piscicidal antibiotic
Adv. Appl. Microbiol. 16, 55-96

Lenzen, S. and Klöppel, G. (1984):
Intracellular localisation of calcium in pancreatic B-cells in relation to Insulin secretion by the perfused ob/ob mouse pancreas
Endocrinology 114, 1012-1020

Lewin, L. (1962):
Gifte und Vergiftungen, 670
Karl F. Haug Verlag, Ulm/Donau

Lipinska, E. (1977):
Nisin and its application
in: Woodbine, M. (ed.)
Antibiotics and antibiosis in agriculture, 103-130
Butterworth, London

Lüthy, P. (1980):
Insecticidal Toxins of Bacillus thuringiensis
FEMS Letters 8, 1-8

Manske, R.H.F. (1965):
The Carboline Alkaloids
in: The Alkaloids, Chemistry and Physiology, Vol. III, 47-53
Acad. Press, New York, London

Marquis, R.E. (1965):
Nature of bactericidal action of Antimycin A for Bacillus megaterium
J. Bacteriol. 89, 1453-1459

Martindale, The Extra Pharmacopoeia (1982):
Reynolds, J.E.F. (ed.) 28th ed., 925
The pharmaceutical press, London

Matthaei, H., Heller, G., Voigt, H.P., Neth, R., Schäch, G. and Kübler, H. (1972):
Analysis of a genetic code by amino acid adapting
in: Shugar, D.
Genetic elements
Acad. Press, New York, Londen

Matthews, H.W. and Wade, B.F. (1977):
Pharmacologically active compounds from microbial origin
Adv. Appl. Microbiol. 21, 269-288

McIsaac, W.M., Khairallah, P.A. and Page, I.H. (1961):
10-Methoxyharmalan, a potent serotonin antagonist which affects conditioned behavior
Science 134, 674-675

Misato, T., Ko, K. and Yamaguchi, J. (1977):
Use of Antibiotics in Agriculture
Adv. Appl. Microbiol. 21, 53-88

Naranjo, C. (1979):
Psychotropic properties of the Harmala Alkaloids
in: Efron, D.H., Klime, N.S., Holmstedt, B. (eds.)
Ethnopharmacologic Search for Psychoactive Drugs, 385-391
Raven Press, New York

Neft, N. and Farley, T.M. (1972):
Studies on the biosynthesis of Antimycin A: I. Incorporation of ^{14}C-labeled metabolites into 3-Formamidosalicyl moiety
J. Antib. 25, 298-303

Nonomura, H. (1974):
Key for classification and identification of 458 species of the Streptomycetes included in ISP
J. Ferment. Technol. 52, 78-92

Ogawa, H., Imai, S., Satoh, A. and Kojima, M. (1983):
An improved method for the preparation of Streptomycetes and Micromonospora protoplasts
J. Antib. 36, 184-186

Okanishi, M., Suzuki, K. and Umezawa, H. (1974):
Formation and reversion of Streptomycete Protoplasts: Cultural condition and morphological study
J. Gen. Microbiol. 80, 389-400

Omura, S., Iwai, Y., Suzuki, Y., Awaya, J., Konda, Y. and Onda, M. (1976):
Production of Quinoline-2-Methanol and Quinoline-2-Methanolacetat by a new species of Kitasatoa, Kitasatoa griseophaeus
J. Antib. 24, 797-803

Omura, S., Tanaka, H., Awaya, J., Narimatsu, Y., Konda, Y. and Hata, T. (1974):
Pyrindicin, a New Alkaloid from a Streptomyces Strain. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activity
Agr. Biol. Chem. 38, 899-906

Ramachandran, S. and Gottlieb, D. (1961):
Mode of action of antibiotics. II Specifity of action of Antimycin A and Ascosin
Biochim. Biophys. Acta 53, 396-403

Řeháček, Z., Kannan, L.V., Ramankutty, M. and Puza, M. (1968):
Relation of Tryptophan metabolism to Antimycin A biosynthesis in Streptomyces antibioticus
Hind. Antib. Bull. 10, 280-286

Řeháček, Z., Ramankutty, M. and Kozová, J. (1968):
Respiratory chain of Antimycin A-producing streptomyces antibioticus
Appl. Microbiol. 16, 29-32

Riccio, P., Günther, H. and Quagliariello, E. (1981):
2n-Nonyl-4-hydroxy(3-^{3}H)quinoline N-oxide: Interaction with the mitochondrial membrane
Eur. J. Biochem. 114, 153-157

Rieske, J.S. (1967):
Antimycin A
in: Gottlieb, D. and Shaw, P.D. (eds.)
Antibiotics Vol. I, 542-578
Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin

Schanz, D. (1978):
Antibiotika aus Aspergillus funiculosus. Untersuchungen zur Isolierung, Charakterisierung und Wirkweise
Dissertation Tübingen

Schilling, G., Berti, D. and Kluepfel, D. (1970):
Antimycin A Components. II: Identification and analysis of Antimycin A fractions by pyrolysis-gas liquid chromatographie
J. Antib. 23, 81-90

Schneider, G. (Hrsg.) (1975):
Pharmazeutische Biologie- Pharmakognosie
276-277
Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich

Schwarz, U., Asmus, A. and Frank, H. (1969):
Autolytic enzymes and cell division of Escherichia coli
J. Mol. Biol. 41, 419-429

Seghal, S.N., Saucier, R. and Vézina, C. (1976)
Antimycin A fermentation. II. Fermentation in aerated-agitated fermenters
J. Antib. 29, 265-273

Shirahama, T., Furumai, T. and Okanishi, M. (1981):
A modified regeneration method for Streptomycete protoplasts
Agric. Biol. Chem. 45, 1271-1273

Sisler, H.D. (1969):
Effect of fungicides on protein and nucleic acid synthesis
Ann. Rev. Phythopath. 7, 311-330

Soerens, D., Sandrin, J., Ungemach, F., Mokry, P., Wu, G.S., Yamanaka, E., Hutchins, L., DiPierro, M. and Cook, J.M. (1979):
Study of the Picted-Spengler reaction in aprotic media: Synthesis of the ß-Galactosidase inhibitor, Pyridindolol
J. Org. Chem. 44, 535-545

Spycher, M.O., Gross, B. und Nydegger, U.E. (1983):
Die Bindung von Ig G und Aggregaten davon an menschliche Thrombozyten kann durch Verwendung von Deoxyglucose und Antimycin A zur Sättigung gebracht werden
Schweiz. med. Wochenschrift 113, 1469-1471

Stapley, E.O. and Woodruff, H.B. (1982):
Avermectins, antiparasitic lactones produced by streptomyces avermitilis isolated from a soil in Japan
in: Trends in Antibiotic Research, 154-170
Jap. Antib. Soc.

Stille, G. (1983):
Psychopharmaka
in: Estler, C.J. (Hrsg.)
Lehrbuch der allgemeinen und systematischen Pharmakologie und Toxikologie, 180-182
F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York

Terashima, T., Kuroda, Y. and Kaneko, Y. (1970):
Studies on Alkaloids of Streptomyces. Part II. Pharmacological Activity and Isolation of Nigrifactin and Taxonomical Studies of Streptomyces Strain No. FFD-101
Agr. Biol. Chem. 34, 753-759

Thayer, W.S. and Rubin, E. (1982):
Antimycin inhibition as a probe of mitochondrial function in isolated rat hepatocytes. Effects of chronic ethanol consumption
Biochim. Biophys. Acta 721, 328-335

Venturoli, G. and Melandri, B.A. (1982):
The localized coupling of bacterial photophosphorylation. Effect of Antimycin A and N,N Dicyclohexylcarbodiimide in chromatophores from Rhodopseudomonas sphaeroides, Ga, studied by single turnover event analysis
Biochim. Biophys. Acta 680, 8-16

Wagner, H. (Hrsg.) (1980):
Pharmazeutische Biologie: Drogen und ihre Inhaltsstoffe, 156-159
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

Walter, P., Lardy, H.A. and Johnson, D. (1967):
Antibiotics as tools for metabolic studies. X. Inhibition of Phosphoryl transfer reactions in Mitochondria by Peliomycin, Ossamycin and Venturicidin
J. Biol. Chem. 242, 5014-5018

Wanning, M. (1980):
Hydroxyethylclavam und andere Antibiotika aus Streptomyces antibioticus Tü 1718. Untersuchungen zur Isolierung, Charakterisierung und Wirkungsweise
Dissertation Tübingen

Wolf, H. and Fischer, E. (1983):
Kirromycin and related antibiotics.
in: Hahn, F.E (ed.)
Antibiotics Vol. VI. Modes and Mechanisms of Microbial Growth Inhibitors, 71-89
Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin

Woodruff, H.B. (1980):
Natural products from microorganisms
Science 208, 1225-1229

Yu, L. and Yu, C.A. (1983):
The existence of an Antimycin A insensitive Ubiquinol-Cytochrome C reductase activity in the photosynthetic apparatus
Biochem. Biophys. Res. Com. 112, 450-457

Zähner, H. (1977):
Einige Aspekte der Antibiotica-Forschung
Angew. Chem. 89, 696-703

Zähner, H. (1982 a):
Mikrobieller Sekundärstoffwechsel
in: Präve, P., Faust, U., Sittig, W., Sukatsch, D.A. (eds.)
Handbuch der Biotechnologie, 83-103
Akademische Verlagsgesellschaft, Wiesbaden

Zähner, H., Anke, H. and Anke, T. (1983):
Evolution and secondary pathways
in: Bennett, J.W. and Ciegler, A. (eds.)
Secondary metabolism and differentiation in fungi, 153-171
Marcel Dekker Inc., New York, Basel

Zähner, H., Drautz, H. and Weber, W. (1982):
Novel approaches to metabolite screening
in: Bu'Lock, J.D., Nisbet, L.J., Winstanley, D.J. (eds.)
Bioactive Microbial Products, Search and Discovery, 51-70

Zähner, H. and Maas, W.K. (1972):
Biology of Antibiotics
Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin

Lebenslauf

Barbara Maria Wahl, geb. Hiller

geboren am 16. Juli 1957 in Rastatt

Vater: Ernst Hiller, Studiendirektor
Mutter: Maria Hiller, geb. Falk

verheiratet mit Dr. Martin Wahl seit 26. Mai 1983

1964 - 1967	Besuch der Grundschule Rastatt
1967 - Mai 1976	Besuch des Ludwig-Wilhelm-Gymnasiums (neuspr.I) in Rastatt
Mai 1976	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
Oktober 1976	Beginn des Pharmaziestudiums an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg
September 1978	Bestehen des ersten Abschnittes der Pharmazeutischen Prüfung in Freiburg
März 1980	Bestehen des zweiten Abschnittes der Pharmazeutischen Prüfung in Freiburg
April 1980 - April 1981	Pharmaziepraktikum in der Central-Apotheke, Rastatt, unter der Leitung von Herrn Apotheker Robert Lochbühler
April 1981	Bestehen der Pharmazeutischen Prüfung in Stuttgart
Mai 1981	Erteilung der Approbation als Apotheker
1. Juni 1981	Beginn der Arbeit zur vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl Mikrobiologie I, Institut für Biologie II der Universität Tübingen, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner Gleichzeitig Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl Mikrobiologie I
September 1984	Abschluß der Arbeiten an der hier vorliegenden Dissertation

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Professor Dr. H. Zähner waren die Herren Professoren

E. Reinhard (Pharmazeutische Biologie, Universität Tübingen)

H. H. Otto, F. R. Preuss, W. Schneider (Pharmazeutische Chemie)

H. Rimpler (Pharmazeutische Biologie)

K. Bauer (Pharmazeutische Technologie)

W. Bernauer, G. Hertting, R. Kretzschmar, K. Starke
(Pharmakologie und Toxikologie)

K. Hummel (med. Mikrobiologie)

A. Niehaus (Physik)

J. Lehmann, C. Ruechardt (organische Chemie)

H. Vahrenkamp (allgemeine und anorganische Chemie)

H. Weisz (analytische Chemie)

alle Universität Freiburg